# Sekundär-Carotinoide in Grünalgen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
an der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
**Dr. Franz-Christian Czygan**

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1968

1967

1968 № 295

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. K. Brodersen |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. E. Kessler |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. W. Haupt |
| 3. Berichterstatter: | Prof. Dr. H. J. Bestmann |

| | |
|---|---|
| Tag des Colloquiums: | 15. 7. 1967 |
| Tag der Probevorlesung: | 26. 7. 1967 |

Sonderdruck aus:

Archiv für Mikrobiologie 61, 81-102 (1968)
Archiv für Mikrobiologie 62, 209-236 (1968)

Meinem Vater

WILHELM KARL AUGUST CZYGAN

(geb.: am 14. Juni 1900 - gef.: im Frühjahr 1945)

in Dankbarkeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535718_0048

Archiv für Mikrobiologie 61, 81—102 (1968)

# Sekundär-Carotinoide in Grünalgen

## I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen

Franz-Christian Czygan

Botanisches Institut der Universität, Erlangen

Eingegangen am 25. November 1967

*Secondary Carotenoids in Green Algae*

*I. Chemistry, Occurrence, and Factors Controlling the Biogenesis of these Polyenes*

*Summary.* 1. Secondary carotenoids (SC) are defined as carotenoids synthesized by organisms or by parts of them at the end of the growth phase instead of or in addition to the primary carotenoids.

2. The following oxo-derivatives of β-carotene have been identified as SC: 3,3′-dioxi-4,4′-dioxo-β-carotene (astaxanthin); 3-oxi-4,4′-dioxo-β-carotene; 3-oxi-4-oxo-β-carotene; 4,4′-dioxo-β-carotene (canthaxanthin); and 4-oxo-β-carotene (echinenone). The oxipolyenes are esterified.

3. The ability of 164 strains of *Chlorophyta* (148 *Chlorococcales*, 15 *Volvocales*, 1 *Siphonales*) to produce SC has been tested (Tab. 1).

4. The synthesis of SC takes place within the chloroplast. The production of fatty oils runs synchronously. The SC diffuse into the fat vacuoles, where they become esterified.

5. The synthesis of SC begins after the reduction of growth which is caused especially by nitrogen deficiency. After addition of nitrogen sources the SC disappear and the primary pigments appear again.

6. There is no direct influence of light on the biogenesis of these polyenes.

7. Glucose, acetate, pyruvate, and succinate increase the concentration of primary carotenoids, but not that of the chlorophylls and the SC. The effects of these compounds on the production of SC seem to be indirect. Growth is stimulated and the nitrogen supply is exhausted earlier. Thus the synthesis of SC begins.

*Zusammenfassung.* 1. Sekundär-Carotinoide (SC) sind Carotinoide, die in Organismen oder in ihren Organen meist gegen Ende ihrer Entwicklungsperioden an Stelle oder in Ergänzung der primären, normalerweise vorhandenen Carotinoide synthetisiert werden.

2. Bei den SC handelt es sich bevorzugt um Oxoderivate des β-Carotins: 3,3′-Dioxi-4,4′-dioxo-β-carotin (Astaxanthin); 3-Oxi-4,4′-dioxo-β-carotin; 4,4′-Dioxo-β-carotin (Canthaxanthin); 3-Oxi-4-oxo-β-carotin; 4-Oxo-β-carotin (Echinenon). Die Oxi-Polyene sind im nativen Zustand verestert.

3. 164 Stämme aus der Klasse der *Chlorophyta* (148 Chlorococcale, 15 Volvocale, 1 Siphonale) wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, SC zu bilden (vgl. Tab. 1).

4. Die SC werden vermutlich innerhalb der Chloroplasten synthetisiert. Synchron dazu verläuft die Bildung fetter Öle. Die SC difundieren in die Fettvacuolen und werden verestert.

5. Die Algen häufen SC bei vermindertem Stoffwechsel, insbesondere bei N-Mangel an. Diese Fähigkeit ist artspezifisch und unabhängig von den Kulturbedingungen (z. B. von der N-Quelle). N-Mangelalgen bauen bei Zusatz von N die SC wieder ab und die primären Pigmente erneut auf.

6. Licht beeinflußt die Biogenese der SC nur indirekt über die Steigerung des Stoffwechsels.

7. Zusätze von Kohlenhydraten, Acetat, Pyruvat und Succinat erhöhen die Konzentration an SC nicht. Der Einfluß dieser Substanzen auf die SC-Bildung ist indirekt. Sie steigern das Wachstum, so daß die N-Quelle schneller verbraucht wird. Infolgedessen setzt die Synthese der SC früher als in Normalkulturen ein.

Gegen Ende der Entwicklungsperioden vieler photo-autotropher Pflanzen wird ihre Farbstoffzusammensetzung verändert. Diese sekundäre Pigmentgarnitur unterscheidet sich entweder nur quantitativ von der primären oder enthält zusätzlich neu synthetisierte Komponenten, die meistens chemisch nicht mit den primären Verbindungen übereinstimmen. Beispiele für die Bildung sekundärer Pigmente in höheren Pflanzen sind die Verfärbung grüner Knospenblätter zu bunten Blütenblättern, die Herbstfärbung grüner Laubblätter oder das Rotwerden grüner Früchte während der Reife.

Ebenso wird bei einer Reihe von Grünalgen bei vermindertem Wachstum, ausgelöst durch Mineralsalz-, insbesondere durch Stickstoffmangel, die primäre Pigmentgarnitur sekundär verändert (Zusammenfassungen bei Dersch, 1960; Pringsheim, 1963 p. 399; Kessler, 1967; Kessler u. Czygan, 1967). In manchen Fällen unterscheidet sich die sekundäre von der primären Zusammensetzung nur quantitativ. Die primären Pigmente (bei den Chlorophyceen: vor allem $\alpha$- und $\beta$-Carotin, Lutein, Luteinepoxid, Violaxanthin, Neoxanthin, Chlorophyll a und b) werden mehr oder weniger stark abgebaut. Die Algen erscheinen grünlich-gelb bis weiß. Sekundär treten keine neuen Farbstoffe auf. Andere Arten werden dagegen bei N-Mangel orange bis orange-rot. Hier lassen sich oft von den primären chemisch abweichende Pigmente nachweisen.

Im Falle der Carotinoide bezeichnen wir diese zusätzlichen Polyene als Sekundär-Carotinoide (SC[1]). Unter SC verstehen wir also definitionsgemäß Carotinoide, die in Organismen oder in ihren Organen meist gegen Ende ihrer Entwicklungsperioden in Ergänzung oder an Stelle der primären, normalerweise vorhandenen Carotinoide synthetisiert werden.

Nach bisherigen Untersuchungen handelt es sich bei den SC der Grünalgen hauptsächlich um Oxocarotinoide. Eine Ausnahme bilden die SC bei *Trentepohlia aurea* (Czygan u. Kalb, 1966) und bei *Dunaliella*-Arten (Fox u. Sargent, 1938; eigene unveröffentlichte Versuche). In beiden Fällen wird bei N-Mangel vermehrt $\beta$-Carotin synthetisiert.

Die SC erregten einmal unser Interesse, da allgemein Sekundärstoffe bei Grünalgen wenig untersucht worden sind. Zum anderen glauben wir mit Experimenten zur Biochemie und zur Biogenese der SC die Frage einer Klärung näher zu bringen, inwieweit Organismen mit einem auf

[1] Abkürzungen: SC: Sekundärcarotinoide; sc: säulenchromatographisch; dc: dünnschichtchromatographisch.

ein Minimum herabgesetzten Stoffumsatz zu spezifischen Syntheseleistungen fähig sind. Immerhin wäre es denkbar, daß unter diesen Bedingungen physiologisch unkontrollierbare Stoffwechselprozesse ablaufen, die z. B. nur in Nebenreaktionen unregelmäßig SC synthetisieren.

Weiter gewannen unsere Untersuchungen an Bedeutung, als gezeigt werden konnte, daß die Fähigkeit zur Bildung von SC (neben weiteren physiologisch-biochemischen Kriterien, wie Hydrogenaseaktivität, pH-Abhängigkeit des Wachstums und Gelatineverflüssigung) als chemotaxonomisches Merkmal in verschiedenen Chlorococcalen-Gattungen verwendet werden kann (vgl. die Zusammenfassung für die Gattung *Chlorella*: Kessler, 1967; für die Gattungen *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus*: Kessler u. Czygan, 1967).

## Material und Methodik

### *Algen und Kulturbedingungen*

Es wurden die in Tab. 1 aufgeführten Grünalgen untersucht. Die Anzucht erfolgte unter den von Kessler u. Mitarb. (1963) angegebenen Bedingungen. Wir verwendeten folgende Nährlösungen:

Lösung 1: anorganische Normal-Nährlösung nach Kessler u. Mitarb. (1963) mit $8 \cdot 10^{-3}$ m $KNO_3$. — Lösung 2: anorganische Stickstoffmangel-Nährlösung nach Kessler u. Mitarb. (1963) mit $8 \cdot 10^{-4}$ m $KNO_3$. — Lösung 3: organische Normal-Nährlösung: Lösung 1 + 0,2% Glucose + 0,2% Hefeextrakt (3753 Merck) + 0,3% Pepton aus Casein (7213 Merck). — Lösung 4: organische Stickstoffmangel-Nährlösung: Lösung 2 + 0,2% Glucose + 0,2% Hefeextrakt (3753 Merck) + 0,03% Pepton aus Casein (7213 Merck). — Lösung 5: Vitamin-Nährlösung nach Hutner u. Mitarb. (1953) mit $NH_4^+$-Salzen und Aminosäuren als N-Quellen. — Lösung 6: *Hydrodictyon*-Nährlösung nach Neeb (1952) mit Nitrat als N-Quelle.

In den meisten Fällen wurden die Algen als Normalkultur in Lösung 1 und als N-Mangelkultur in Lösung 2 herangezogen. Ausnahmen sind in Tab. 2 angeführt. Die SC der Algen untersuchten wir nach 4—6wöchiger Kultur der Organismen in Stickstoffmangel-Nährlösung.

### *Bestimmung der Pigmente*

Die Chlorophylle bestimmten wir quantitativ nach Röbbelen (1957).

Zur qualitativen Untersuchung der nativen Farbstoffe wurden die abzentrifugierten und gewaschenen Algen mit etwas Seesand (p.a.), etwas $Na_2CO_3$ (p.a.) und Aceton (p.a. bzw. reinst) im Porzellan-Mörser zerrieben und mit Aceton bis zur Farblosigkeit extrahiert. Diese Farbstofflösung engten wir im Vacuum oder unter $N_2$ bis zur Trockne ein und nahmen den Rückstand mit wenig Hexan oder Aceton für die säulenchromatographische (sc) bzw. für die dünnschichtchromatographische (dc) Trennung auf.

Zur Verseifung der nativen Pigmente und der Lipide lösten wir den Gesamtrückstand in 10% methanolischer KOH, ließen die Suspension 2 Std im Dunkeln unter $N_2$ stehen und überführten die Carotinoide nach den üblichen Verfahren in Äthyläther (p.a. bzw. reinst) (Dersch, 1960).

Die Carotinoide trennten und isolierten wir sc mit Maisstärke (Maizena) als Adsorbens und mit Petroläther (Siedepunkt 40—60° C)/Aceton-Gemischen als Eluationsmittel nach Dersch (1960) und dc in Anlehnung an die Angaben von Kessler u. Czygan (1965). Wir verwendeten Kieselgel-G-Platten als Adsorbens

(30 g Kieselgel-G, Merck, + 60 ml Aqua dest. für fünf Platten von 200×200 mm Größe; Schichtdicke 0,25 mm; bei 60—80°C getrocknet) und ein Gemisch von 90 Vol.T. Benzin (Siedepunkt 100—140°C) + 10 Vol.T. Isopropanol + 70 Vol.T. Chloroform + 0,3 Vol. T. Aqua dest. als Laufmittel. In einigen Fällen benutzten wir die Systeme von Hager u. Bertenrath (1962) und Hager u. Meyer-Bertenrath (1966) sowie die von Egger (1962) und Egger u. Voigt (1965).

Die exakte Trennung der Carotinoide in den von uns verwendeten chromatographischen Systemen (vgl. Abb. 1) erlaubt zusammen mit spektralphotometrischen Daten (Zeiss-Spektralphotometer PMQII), mit Hilfe der Co-Chromatographie authentischer Verbindungen und mit bereits an anderer Stelle mitgeteilten Methoden (Dersch, 1960; Czygan, 1964a, 1966; Czygan u. Kessler, 1967) eine eindeutige Identifizierung der Pigmente. Nur aus wenigen Algen konnten die Polyene kristallin gewonnen werden. Zur Schmelzpunktbestimmung wurden sie aus einem Benzol/Methanol-Gemisch ein- bis zweimal umkristallisiert (Tab. 3).

Für die quantitative Messung der Carotinoide (Astaxanthin wurde als Astacin bestimmt) benutzten wir folgende Extinktionskoeffizienten:

| Carotinoid | Wellenlänge in nm | Lösungsmittel | $E^{1\%}_{1\,cm}$ | Literatur |
|---|---|---|---|---|
| β-Carotin | 452 | Hexan | 2500 | eigene Messung |
| | 444 | Äthyläther | 2080 | Goodwin (1955) |
| α-Carotin | 444 | Hexan | 2800 | Isler u. Schudel (1963) |
| Echinenon | 458 | Hexan | 2158 | Davies (1965) |
| Canthaxanthin | 466 | Hexan | 2200 | Davies (1965) |
| Astacin | 498 | Pyridin | 1690 | Isler u. Schudel (1963) |
| Lutein | 475 | $C_2S$ | 2160 | Goodwin (1955) |
| | 447 | Äthanol | 2550 | Goodwin (1955) |
| Violaxanthin | 441 | Äthanol | 2550 | Goodwin (1955) |
| Neoxanthin | 438 | Äthanol | 2270 | Goodwin (1955) |
| Rest-Xanthophylle (ohne Oxopolyene) | 445 | Hexan | 2500 | Dersch (1960) |

*Bezugsgrößen*

Normalerweise bezogen wir die quantitativen Pigmentwerte auf das Trockengewicht (2 Std bei 105°C getrocknet). In einigen Fällen wählten wir die Angaben in Milligramm Pigment je Kulturkolben (mit 300 ml Nährlösung), um Veränderungen im absoluten Pigmentgehalt der Kulturen genauer zu erfassen.

Weitere methodische Einzelheiten finden sich an den entsprechenden Textstellen.

## Ergebnisse und Diskussion

*Chemie der Sekundär-Carotinoide*

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die SC mit wenigen Ausnahmen Oxoderivative des β-Carotins sind (Dersch, 1960; Czygan, 1964a, 1966; Czygan u. Kessler, 1967; siehe Abb. 2): 3,3′-Dioxi-4,4′-dioxo-β-carotin (Astaxanthin); 3-Oxi-4,4′-dioxo-β-carotin; 4,4′-Dioxo-β-carotin (Canthaxanthin) und 4-Oxo-β-carotin (Echinenon). Die Oxi-

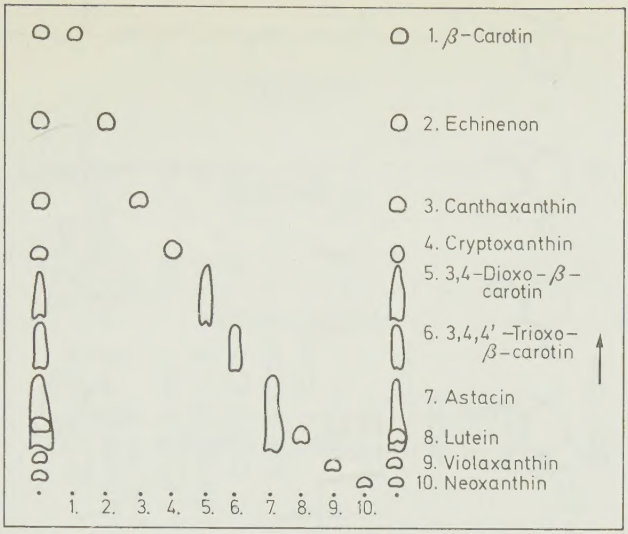


Abb. 1. Kopie eines Dünnschichtchromatogramms nach Kessler u. Czygan (1965) mit authentischen Carotinoiden

verbindungen[2] sind in den Algen verestert (Abb. 3 und 4; vgl. Kleinig, 1966, 1967; Kleinig u. Egger, 1967). Nach der Lage dieser Ester in Verteilungs- und Adsorptionschromatogrammen handelt es sich um Mono- und Diester. Vergleichschromatogramme mit synthetischen Astaxanthinestern (zur Synthese vgl. Karrer u. Jucker, 1948) zeigen, daß der Hauptester (ca. 50% der Gesamtester) z. B. in *Ankistrodesmus braunii 202—7c* Astaxanthindipalmitat, ein weiterer Astaxanthinmonolinolenat entspricht. Inwieweit daneben Derivate anderer Fettsäuren und gemischte Ester vorkommen, sollen gaschromatographische Bestimmungen klären.

Es ist bekannt, daß die Triglyceride von Grünalgen sehr reich an ungesättigten Fettsäuren sind (bei N-Mangelkulturen von *Chlorella 211—8b, 211—14a, 211—8m*; *Ankistrodesmus 202—7c*; *Haematococcus 114* beträgt der Fettanteil bis etwa 60% vom Trockengewicht; Kessler u. Czygan, unveröffentlicht). So fanden z. B. Klenk u. Mitarb. (1963) in einer *Chlorella „pyrenoidosa"* neben 19,7% Palmitinsäure, 12,9% $C_{16}$-Polyen- und 67,3% $C_{18}$-Polyensäuren. Es wird also bei den für die Veresterung von Astaxanthin benutzten Fettsäuren eine gewisse Auswahl getroffen.

[2] Diese *Oxi*-Oxopolyene sind in den Algen die nativen Pigmente (vgl. auch Dersch, 1960). Im alkalischen Milieu und in Gegenwart von Sauerstoff werden sie zu den entsprechenden Oxoderivaten oxidiert (vgl. Kuhn u. Sörensen, 1938; siehe Abb. 2).

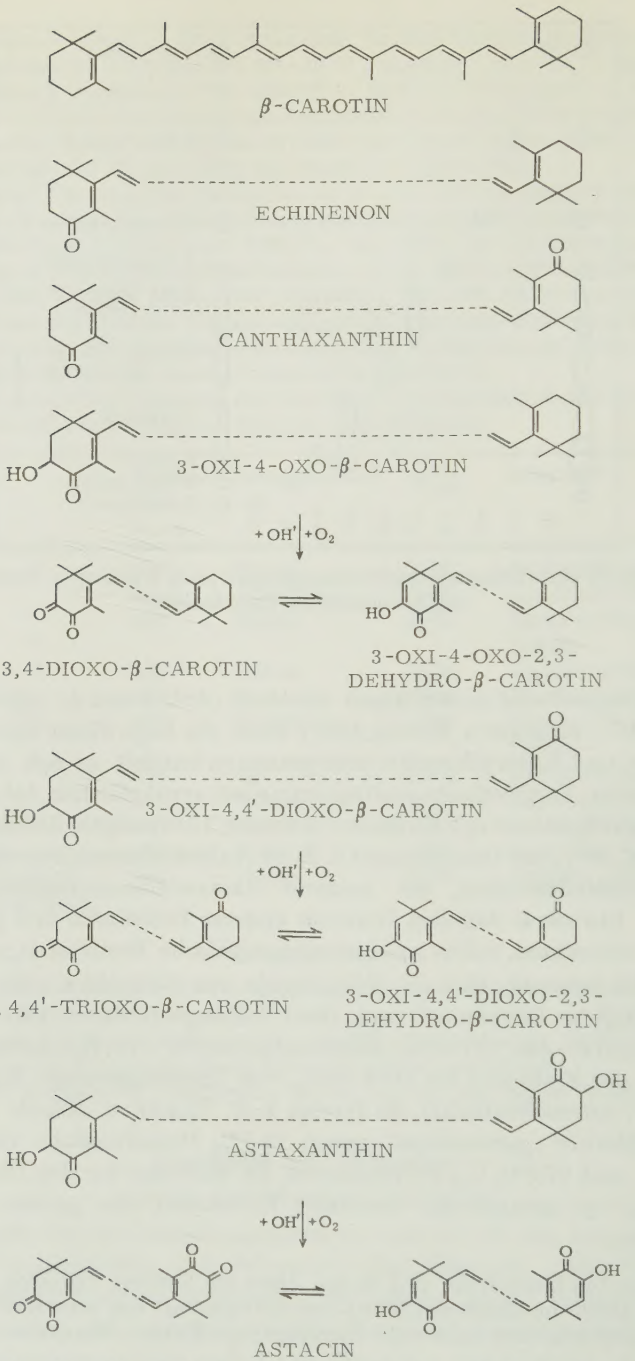


Abb. 2. Strukturformeln verschiedener Ketocarotinoide aus Grünalgen. In Gegenwart von Luftsauerstoff und im alkalischen Milieu werden die Oxi-Oxopolyene oxidiert. Die Reaktionsprodukte liegen als Keto- bzw. als Enol (Alkalisalz)-Verbindungen vor

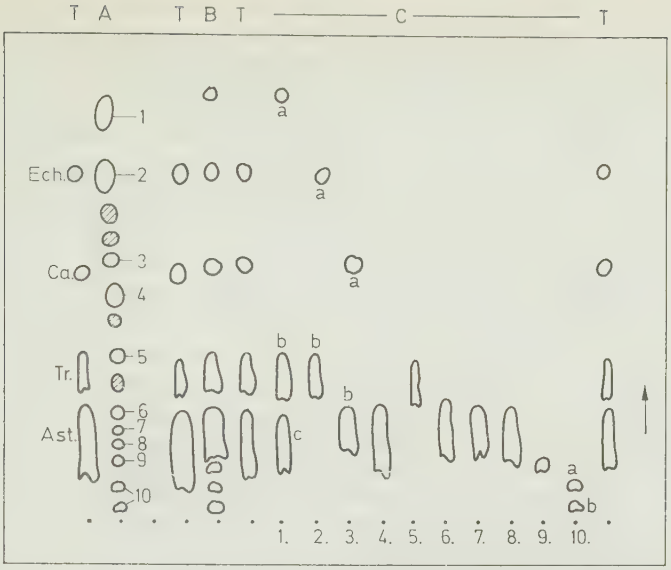


Abb. 3. Kopie eines Dünnschichtchromatogramms (nach Kessler u. Czygan, 1965) mit nativen (A) und verseiften (B: Gesamtextrakt; C: Einzelpigmente) Farbstoffen aus 6 Wochen alten Kulturen (Lösung 3) von *Chlorococcum wimmeri 213-4*. *T* authentische Testsubstanzen; *Ech* Echinenon; *Ca* Canthaxanthin; *Tr* 3,4,4′-Trioxo-β-carotin; *Ast* Astacin; ◍ Chlorophylle und Chlorophyllderivate in Spuren. *1—10* verseifte Einzelpigmente des nativen Gesamtextrakts A. *1a* β-Carotin; *1b* Tr; *1c* Ast; *2a* Ech; *2b* Tr; *3a* Ca; *3b* Ast; *4* Ast; *5* Tr; *6*, *7*, *8* Ast; *9* Lutein; *10a* Violaxanthin; *10b* Neoxanthin

In den von uns untersuchten Algen waren weitere Keto- oder Oxi-oxocarotinoide nicht eindeutig zu identifizieren. Gelegentlich trat in den Kulturen von *Chlorococcum wimmeri 213—4* (kultiviert in Lösung 3) ein Pigment auf, das nach der Verseifung oberhalb des Trioxo-β-carotins und unterhalb, manchmal auch in Höhe des Canthaxanthins im Chromatogramm nach Kessler u. Czygan (1965), jedoch in Höhe oder nur wenig oberhalb des Canthaxanthins im Chromatogramm nach Egger u. Voigt (1965) zu finden war. Seine Absorptionsmaxima (in Hexan: 458 bis 460 nm; in Chloroform: 480 nm; in Äthanol: 472 nm; nach Reduktion mit $LiAlH_4$ [in absol. Äther] in Hexan: 425, 447, 475 nm) und nicht trennbare Banden nach Co-Chromatographie mit authentischer Substanz weisen auf 3,4-Dioxo-β-carotin hin (Abb. 2; zur Diskussion über die Identität dieser Verbindung mit dem Euglenanon aus *Euglena gracilis* oder aus *Adonis annua* vgl. Krinsky u. Goldsmith, 1960; Weedon, 1965, 1967; Egger u. Kleinig, 1967). In der Pflanze liegt es als Ester des 3-Oxi-4-oxo-β-carotins vor. Di Accadia u. Mitarb. (1966)

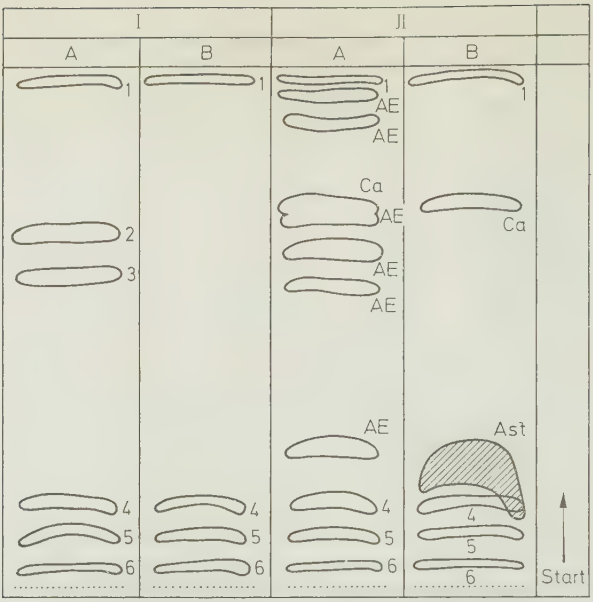


Abb. 4. Kopie eines Dünnschichtchromatogramms (nach Kessler u. Czygan, 1965) mit nativen (A) und verseiften (B) Pigmentextrakten aus 4 Wochen alten Normal(I)- und Stickstoffmangel(II)-Kulturen von *Chlorella fusca 211-15*. *1* β-Carotin; *2* Chlorophyll a; *3* Chlorophyll b; *4* Lutein; *5* Violaxanthin; *6* Neoxanthin; *Ca* Canthaxanthin; *AE* Astaxanthinester; *Ast* Astacin; zwischen 4 und 5 lassen sich gelegentlich weitere Epoxide in Spuren nachweisen

beschrieben ein ähnliches Pigment aus *Dictyococcus cinnabarinus*. Bei dem von uns untersuchten Stamm dieser Art gelang der Nachweis nicht.

### *Vorkommen der Sekundär-Carotinoide*

Ketocarotinoide sind in verschiedenen Chlorophyten nachgewiesen worden: z. B. in *Acetabularia mediterranea* (Richter, 1958; Kleinig u. Egger, 1967), in *Ankistrodesmus-* und *Scenedesmus*-Arten (Dersch, 1960; Šesták u. Baslerová, 1963; Czygan, 1966; Kessler u. Czygan, 1967), in *Brachiomonas simplex* und *Protosiphon botryoides* (v. Bielig, zit. nach Goodwin, 1952), in *Chlamydomonas nivalis* (Viala, 1966), in *Chlorella fusca* (= *pyrenoidosa*) (Dersch, 1960; Kessler u. Mitarb., 1963; Czygan, 1964a; Kessler, 1967; Kessler u. Mitarb., 1968), in *Chlorella zofingiensis* (Šesták u. Baslerová, 1963; Kessler u. Czygan, 1965), in *Chlorococcum*-Arten (Bold u. Parker, 1962; Šesták u. Baslerová, 1963; Czygan u. Kessler, 1967), in *Chromochloris cinnabarina* (Šesták u. Baslerová, 1963), in *Crucigenia apiculata* (Czygan, 1966), in *Dictyococcus cinnabarinus* (Di Accadia u. Mitarb., 1966), in *Haematococcus pluvialis* (Tischer, 1944; Goodwin u. Jamikorn, 1954; Droop, 1955; Šesták u. Baslerová, 1963; Czygan, 1966; Czygan u. Kessler, 1967), in *Hydrodictyon reticulatum* (Dersch, 1960) in *Nanochloris atomus* (Jeffrey, 1961), in *Polytoma uvella* (Links u. Mitarb., 1960), in *Sphaeroplea* (Kleinig, 1967) und in *Spongiochloris typica* (McLean, 1967). Jedoch konnten erst

in den letzten Jahren eine Reihe dieser Oxopolyene mit Hilfe synthetischer authentischer Carotinoide eindeutig identifiziert werden.

Inwieweit auch die Ketocarotinoide einiger Euglenophyten (z. B. Astaxanthin in *Euglena heliorubescens*: Tischer, 1940, und in *Trachelomonas volvocina*: Green, 1963; Echinenon u. a. in *Euglena*-Arten: Krinsky u. Goldsmith, 1960) unserer Definition nach SC sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten (zur Frage der Stigmata-Carotinoide vgl. S. 93).

Wir untersuchten 164 Stämme der *Chlorophyta* (148 Chlorococcale; 15 Volvocale; 1 Siphonale) auf ihre Fähigkeit, bei N-Mangel SC zu synthetisieren (Tab. 1). Ihre primäre und sekundäre Pigmentgarnitur ist in Tab. 4 an einigen Beispielen quantitativ dargestellt.

*Chlorococcales.* Während in der Gattung *Ankistrodesmus* einheitlich Astaxanthin und Spuren von Canthaxanthin (fehlt gelegentlich) vorkommen, sind diese beiden Oxocarotinoide in der Gattung *Chlorella* nur auf die Arten *Chl. fusca* (einschließlich der Varietät *rubescens*) und *Chl. zofingiensis* beschränkt. Damit sind hier die SC zur Abgrenzung der einzelnen Taxa gut geeignet (Kessler, 1967; Kessler u. Mitarb., 1968). In der Gattung *Scenedesmus* sind die um Echinenon ergänzten SC heterogener verteilt. Eine artspezifische Zuordnung der einzelnen Komponenten ist nicht ohne weiteres möglich (Kessler u. Czygan, 1967). Außerdem sind in Mangelkulturen von *Scenedesmus*-Arten im Unterschied zu *Ankistrodesmus*, zu *Chlorella fusca* und zu *Chl. zofingiensis* die Konzentrationen an SC geringer und die an Chlorophyll höher (vgl. Tab. 5). Inwieweit die relative Verschiebung des Gehalts an beiden Pigmenttypen für unsere Hypothese der SC-Bildung von Bedeutung ist, bleibt bisher ungeklärt (Czygan, 1968). Möglicherweise stehen die *Scenedesmus*-Arten in bezug auf die SC-Synthese zwischen Arten, die Oxocarotinoide bilden können, und solchen, die dazu nicht in der Lage sind.

Noch größer ist die Variationsbreite in der Gattung *Chlorococcum*. *C. echinozygotum* bleicht bei N-Mangel nur sehr langsam aus. *C. humicolum*, *C. hypnosporum*, *C. minutum* und *C. vacuolatum* verlieren unter diesen Bedingungen fast völlig ihre Chlorophylle und erscheinen gelblich bis grünlichgelb. *C. multinucleatum*, *C. infusionum* und *C. oleofaciens* synthetisieren nach Abbau der Chlorophylle unterschiedliche Mengen Astaxanthin, Canthaxanthin und Echinenon. Schließlich bildet *C. wimmeri* bereits unter Normalbedingungen zusätzlich zu diesen drei Oxopolyenen noch 3-Oxi-4,4′-dioxo-$\beta$-carotin (Czygan u. Kessler, 1967).

Die heterotrophen, farblosen Arten *Prototheca portoricensis 263-5a* und *Hyaloraphidium curvatum 235-1*, vermutlich apochlorotische Formen von *Chlorella*- und *Ankistrodesmus*-Arten (Pringsheim, 1963), bilden weder bei ausreichender noch bei mangelhafter N-Versorgung Carotinoide. Dagegen ist zu beachten, daß die apochlorotische Chlamydomonacee *Polytoma uvella* in den vegetativen Zellen nicht näher identifizierte Polyene und in den Zygosporen verschiedene Ketocarotinoide synthetisiert (Links u. Mitarb., 1960).

Die restlichen Beispiele aus den verschiedenen Chlorococcalen-Gattungen zeigen, daß die Fähigkeit zur SC-Bildung weit verbreitet ist.

*Volvocales.* Auch innerhalb einzelner Volvocalen-Gattungen gibt es Arten, die SC produzieren können, neben solchen, die dazu nicht in der Lage sind. So synthetisiert *Chlamydomonas nivalis* bei N-Mangel Astaxanthinester, Canthaxanthin und Echinenon, während die geprüften Stämme der Arten *Chlam. reinhardii*, *eugametos* und *ovalis* gelblich werden und ausbleichen. Ebenso konnte v. Bielig (zit. nach

Tabelle 1. *Verteilung der Ketocarotinoide Astaxanthin (bestimmt als Astacin = I), 3-Oxi-4,4'-dioxo-β-carotin (bestimmt als 3,4,4'-Trioxo-β-carotin = II), Canthaxanthin (= III) und Echinenon (= IV) in einigen Grünalgen-Stämmen bei Stickstoffmangel.* ( ): *Carotinoide in Spuren bzw. nur gelegentlich nachzuweisen*
Herkunft der Stämme: G: Algen-Sammlung Pringsheim, Göttingen, vgl. Koch (1964). — B: Algen-Sammlung, Bloomington/USA, vgl. Starr (1964). — Beth.: Algen-Sammlung, Bethesda/USA, vgl. Allen (1963). — Cam: Algen-Sammlung, Cambridge/England, vgl. Anonymus (1966). — Cz: eigene Isolierungen

| Art | Herkunft und Nr. der Stämme | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|---|
| *Volvocales* | | | | | |
| *Brachiomonas submarina* var. *pulsifera* Droop | G: *7-2a,2b* | — | — | — | — |
| *Chlamydomonas eugametos* Moevus | G: *11-5a,5b* | | | | |
| *Chlam. nivalis* Wille | G: *11-51* | + | — | + | (+) |
| | Cz: *113*[1] | + | — | + | + |
| *Chlam. oviformis* Pringsheim | G: *11-20* | — | — | — | |
| *Chlam. reinhardii* Dangeard | G: *11-32a,32b* | — | — | — | — |
| *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco | G: *19-3* | — | — | — | — |
| *Haematococcus droebakensis* Wollenweber | G: *34-2* | + | — | + | (+) |
| *H. pluvialis* Flotow em. Wille | G: *34-1c* | + | — | + | — |
| | Cz: *111*[2], *114*[3] | + | — | — | — |
| *H.* spec. | Cz: Regenpfütze bei Erlangen[4] | + | + | — | — |
| *Chlorococcales* | | | | | |
| *Ankistrodesmus ammalloides* Chodat et Oettli | G: *202-1* | + | — | (+) | — |
| *A. braunii* (Naegeli) Collins | G: *202-7a,7b,7c, 7d,7e* | + | — | (+) | — |
| | B: *750* | + | — | (+) | — |
| *A. densus* Korschikoff | G: *202-12* | + | — | (+) | — |
| *A. falcatus* (Corda) Ralfs | B: *749* | + | — | (+) | — |
| *A.f.* var. *acicularis* (A.Br.) G.S.West | B: *101, 748* | + | — | (+) | — |
| *A.f.* var. *duplex* (Kützing) G.S.West | G: *202-9* | + | — | (+) | — |
| *A.f.* var. *spirilliformis* G.S.West | G: *202-2,3,4* | + | — | (+) | — |
| *A.f.* var. *stipitatus* (Chodat) Lemm. | G: *202-5* | + | — | (+) | — |

[1] Aus einer „Blutschnee"-Probe der Ötztaler Alpen (August 1966; leg. K. Kalb) isoliert.

[2] Vgl. Czygan (1966).

[3] Aus einer Algenprobe des Gewächshauses des Botanischen Gartens (Erlangen) isoliert.

[4] Vgl. Czygan u. Kessler (1967).

[5] 1963 aus einem Teich bei Frankenberg/Eder isoliert.

[6] Zur Systematik und genaueren Herkunft der *Chlorella*-Stämme vgl. Kessler (1967).

[7] Gelegentlich war ein dem Echinenon ähnliches Ketocarotinoid nachzuweisen.

[8] Vgl. Kessler u. Mitarb. (1968).

Tabelle 1 (Fortsetzung)

| Art | Herkunft und Nr. der Stämme | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|---|
| *A. nannoselene* Skuja | G: *202-6* | + | — | (+) | — |
| *A. stipitatus* | G: *202-11* | + | — | (+) | — |
| *A.* spec. | G: *202-8,10,13* | + | — | (+) | — |
| | Beth: *C-20.1.1* | + | — | (+) | — |
| | Cz: *104*[5] | + | — | (+) | — |
| *Chlorella*[6] *luteoviridis* Chodat | G: *211-2a,2b,3,4, 5a,5b* | — | — | — | — |
| *Chl. saccharophila* (Krüger) Nadson | G: *211-1a,1b,1c, 1d,9a,9b* | — | — | — | — |
| | Cam: *211-1f* | — | — | — | — |
| | Beth: *C-1.3.1* | — | — | — | — |
| | Stamm *Tamiya*, Stamm *Fott* | — | — | — | — |
| *Chl. vulgaris* Beijerinck | G: *211-1e,8l,8m, 11b,11c,11f,11j, 11l,11p,11q,11r, 11s,11t,12,19,30* | — | — | — | — |
| | Cam: *211-21* | — | — | — | — |
| | B: *395,396* | — | — | — | — |
| | Beth: *C-1.2.2* | — | — | — | — |
| | Stämme *Gilet*, *Řetkovský* | — | — | — | — |
| *Chl. zofingiensis* Dönz | G: *211-14a,14b,14c* | + | — | + | — |
| | Beth: *C-1.2.1* | + | — | + | (+) |
| *Chl. fusca* Shihira et Krauss (= *Chl. I* bzw. *Chl. pyrenoidosa*) | G: *211-8a,8b,8c, 8e,11m,11n,15* | + | — | + | — |
| | Cam: *211-8g,8h* | + | — | + | — |
| | B: *343* | + | — | + | — |
| | Beth: *C-1.1.6* | + | — | + | — |
| | *C-1.1.10* | + | — | + | +[7] |
| *Chl.f.* var. *rubescens* (Dangeard) Kessler et al.[8] | Cam: *232-1* | + | — | + | + |
| *Chl. kessleri* Fott et Nováková (= *Chl. II*) | G: *211-11g,11h* | — | — | — | — |
| | B: *397,398* | — | — | — | — |
| | Beth: *C-1.1.1*, *C-1.1.12*, *C-1.2.2* | — | — | — | — |
| *Chl. vulgaris* f. *tertia* Fott et Nováková (= *Chl. III*) | G: *211-8k,11k,31, 32,33,34,40a, 40c* | — | — | — | — |
| | Cam: *211-11d* | — | — | — | — |
| | B: *1230,261* | — | — | — | — |
| | Beth: *C-1.1.8*, *C-1.6.5*, *C-1.6.7* | — | — | — | — |
| | Stämme Sless *1* u. *2* | — | — | — | — |
| *Chl.* IV (vermutlich keine *Chl.*; vgl. [6]) | G: *211-40b* | — | — | — | — |
| *Chl. minutissima* Fott et Nováková (= *Chl. V*) | Beth: *C-1.1.9* | — | — | — | — |

Tabelle 1 (Fortsetzung)

| Art | Herkunft und Nr. der Stämme | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|---|
| *Chlorococcum echinozygotum* (Naegeli) Starr | G: *213-5* | − | − | − | − |
| *C. humicolum* (Naegeli) Rabenhorst | G: *213-1b* | − | − | − | − |
| *C. hypnosporum* Starr | G: *213-6* | − | − | − | − |
| *C. infusionum* (Schrank) Meneghini | G: *213-2a,2b* | + | − | + | + |
| *C. minutum* Starr | G: *213-7* | − | − | − | − |
| *C. multinucleatum* Starr | G: *213-1a* | + | − | + | + |
| *C. oleofaciens* Trainor et Bold | G: *213-11* | + | − | + | (+) |
| *C. vacuolatum* Starr | G: *213-8* | − | − | − | − |
| *C. wimmeri* Rabenhorst | G: *213-4* | + | + | + | + |
| *Coelastrum proboscideum* Bohlin var. *dilatatum* Vischer | G: *217-2* | + | − | (+) | + |
| *Crucigenia apiculata* (Lemm.) Schm. | G: *218-1* | + | − | + | + |
| *Dictyococcus cinnabarinus* (Chodat et Kol.) Vischer | G: *221-2* | (+) | − | + | + |
| *Hyaloraphidium curvatum* Korschikoff | G: *235-1* | − | − | − | − |
| *Hydrodictyon reticulatum* (L.) Lagerheim | G: *236-1b* | + | − | + | − |
| *Prototheca portoricensis* Ashford, Ciferri et Dalmau | G: *263-5a* | − | − | − | − |
| *Scenedesmus acuminatus* (Lagerh.) Chodat | G: *276-12* | + | − | + | − |
| *S. acutiformis* Schröder | G: *276-11* | + | − | (+) | − |
| *S. basiliensis* Vischer | G: *276-1* | + | − | + | + |
| *S. bijugatus* (Turp.) Kützing | Beth: *C-8.2.1* | + | − | + | − |
| *S. b.* var. *seriatus* Chodat | B: *413* | (+) | − | (+) | − |
| *S. dimorphus* Kützing | G: *276-10* | + | − | + | (+) |
| | B: *746,1237* | + | − | + | (+) |
| *S. dispar* Bréb. | G: *276-13* | + | − | + | (+) |
| *S. longus* Meyen | B: *1236* | + | − | + | + |
| *S. naegelii* Chodat | G: *276-2* | + | − | + | + |
| *S. obliquus* (Turp.) Krüger | G: *276-3a,3d* | + | − | + | − |
| | G: *276-3b,3c,3e* | + | − | + | (+) |
| *S. quadricauda* Bréb. | G: *276-4a* | + | − | + | − |
| | G: *276-4b,4c,4d* | + | − | + | (+) |
| | G: *276-4e* | + | − | + | + |
| *S.* spec. | G: *276-5,6,7,8* | + | − | + | − |
| | G: *276-9,20* | + | − | + | + |
| *Scotiella* spec. | G: *277-1* | + | − | + | + |
| *Selenastrum gracile* Reinsch | G: *278-2* | − | − | − | − |
| *Siphonales* | | | | | |
| *Protosiphon botryoides* (Kütz.) Klebs | G: *731-1a* | + | − | + | +[7] |

Tabelle 2
*Aufzuchtbedingungen für Normal- und Stickstoffmangelkulturen einiger* Chlorophyta

| Art und Stamm | Normalkultur | N-Mangelkultur[a] |
|---|---|---|
| *Ankistrodesmus ammalloides 202-1* | 1 Vol.T. Lösung 1 + 3 Vol.T. Aqua dest. | 1 Vol.T. Lösung 2 + 3 Vol.T. Aqua dest. |
| *Brachiomonas submarina* var. *pulsifera 7-2a, 2b* | Lösung 3 | Lösung 4 |
| *Chlamydomonas reinhardii 11-32a, 32b* | Lösung 1, aber statt $KNO_3$ $NH_4Cl$ und äquivalente Mengen KCl | wie Normalkultur, aber Gesamt-N auf $^1/_{10}$ reduziert |
| *Chlorella zofingiensis 211-14a, 14b, 14c* | Lösung 1, aber pH: 7,0 | Lösung 2, aber pH: 7,0 |
| *Chlorococcum wimmeri 213-4* | Lösung 3, aber ohne Glucose (siehe S. 98. 99) | Lösung 4, aber ohne Glucose |
| *Dunaliella salina 19-3* | Lösung 1 + 6,4% NaCl | Lösung 2 + 6,4% NaCl |
| *Haematococcus droebakensis* 34-2 | Lösung 3 | Lösung 4 |
| *Hyaloraphidium curvatum 235-1* | Lösung 5 bzw. Lösung 3 | Lösung 5, aber Gesamt-N auf $^1/_{10}$ reduziert, bzw. Lösung 4 |
| *Hydrodictyon reticulatum 236-1b* | Lösung 6, aber ohne Erddekokt[b] | wie Normalkultur, aber Gesamt-N auf $^1/_{10}$ reduziert; Ca und K durch äquivalente Mengen CaCl und KCl ersetzt |
| *Prototheca portoricensis 263-5a* | Lösung 5 bzw. Lösung 3 | Lösung 5, aber Gesamt-N auf $^1/_{10}$ reduziert; bzw. Lösung 4 |

[a] In den verschiedenen N-Mangelnährlösungen ist der Gehalt an N so niedrig, daß *Ankistrodesmus braunii 202-7c* nach 10—14tägiger Kultur erste Symptome des N-Mangels zeigt (SC-Bildung).

[b] Während alle anderen Stämme im Dauerlicht herangezogen wurden, kultivierten wir *Hydrodictyon* im 16 Std-Licht/8 Std-Dunkel-Wechsel bei etwa 3000 Lux ohne zusätzliche $CO_2$-Begasung (Neeb, 1952).

Goodwin, 1952) in *Brachiomonas simplex* Astaxanthin nachweisen, während in *Brachiomonas submarina* var. *pulsifera 7-2a, 7-2b* dieses Pigment nicht zu finden ist.

Die normale, primäre Pigmentgarnitur weicht teilweise von derjenigen der Chlorococcalen ab (für *Chlamydomonas reinhardii* vgl. Krinsky u. Levine, 1964; für *Haematococcus* vgl. Tab. 4). In sehr großen Algenmengen, z. B. von *Haematococcus*, lassen sich gelegentlich auch bei genügender N-Versorgung nicht näher identifizierte Ketocarotinoide, möglicherweise Polyene der Stigmata, in Spuren nachweisen. Sie unterscheiden sich aber bereits quantitativ eindeutig von den bei N-Mangel gebildeten SC (zu Ketocarotinoiden als Stigmatafarbstoffe bei Euglenophyten vgl. Goodwin, 1964, p. 329ff.).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß manche bei N-Mangel SC-freie *Chlamydomonas*-Stämme nach der Zygotenbildung Oxopolyene synthetisieren können (Czygan u. Ranneberg, 1968). Inwieweit sich dieses Ergebnis, daß bevorzugt *diploide* Formen der *Volvocales* SC bilden, verallgemeinern läßt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Tabelle 3. *Schmelzpunkte einiger aus Stickstoff-Mangelalgen isolierter Ketocarotinoide Angaben in °C (unkorr.); bestimmt mit dem Mikroskop-Heiztisch 350 (E. Leitz, Wetzlar); /: Carotinoid wird nicht synthetisiert; —: Carotinoid zwar vorhanden, konnte aber nicht kristallin erhalten werden*

| | Astacin | Cantha-xanthin | Echinenon |
|---|---|---|---|
| Authentische Substanz (F. Hoffmann-La Roche, AG, Basel) | *228* | *216—217* | *179* |
| Substanzen isoliert aus: | | | |
| *Ankistrodesmus braunii 202-7c* | *227* | / | / |
| *Chlorella fusca 211-8b* | *228—229* | *215—217* | / |
| *Chlorella zofingiensis 211-14a* | — | *217* | / |
| *Dictyococcus cinnabarinus 221-2* | — | *218* | — |
| *Scenedesmus obliquuus 276-3b* | *226* | — | — |
| *Scenedesmus* spec. *276-9* | — | — | *176* |
| *Haematococcus pluvialis 114* | *228* | *215—218* | *175—178* |
| *Haematococcus pluvialis 34-1c* | *226* | *217* | *175—178* |
| *Crucigenia apiculata 218—1* | — | — | *177* |

Offen bleibt bisher, ob die SC neben weiteren biochemisch-physiologischen Kriterien[3] zur chemotaxonomischen Differenzierung auch der Volvocalen-Gattungen und Arten herangezogen werden können.

*Siphonales.* Der einzige bisher bei N-Mangel untersuchte Vertreter dieser Ordnung, *Protosiphon botryoides 731—1a*, bildet zwar als SC Astaxanthinester, Canthaxanthin und Echinenon, läßt aber eine Verallgemeinerung nicht zu. Allerdings konnten Kleinig u. Egger (1967) zeigen, daß auch *Acetabularia mediterranea* bei intensiver Beleuchtung durch Oxopolyene rot gefärbt wird.

*Verteilung der Sekundär-Carotinoide innerhalb der Zelle*

Unseres Wissens ist die Bildung und Lokalisation der SC innerhalb der Chlorococcalenzelle elektronenoptisch bisher nicht verfolgt worden. Die Verteilung der Lipochrome in der Volvocalen *Haematococcus* bei beginnender Aplanosporenbildung beschreibt Wygasch (1965).

Lichtmikroskopisch läßt sich die mit dem N-Mangel einsetzende Biogenese der SC am Beispiel von *Chlorella fusca 211-8b* beobachten. Nach etwa 10tägiger Kultur in N-Mangel-Lösung (Lösung 2) treten neben normal grünen Zellen solche auf, in deren Chloroplasten einzelne Zentren orangerot gefärbt sind. Bei fortschreitendem N-Mangel fließen diese Zentren zusammen, die Konturen des Chloroplasten verschwimmen, und die gesamte Zelle erscheint unregelmäßig körnig orangerot. Häufig scheinen sich die oben erwähnten Zentren besonders um den Kern herum

[3] Zum Beispiel kann die unterschiedliche Verwertbarkeit von N-Quellen ein solches Charakteristikum sein. Während *Chlamydomonas nivalis*, *Chl. eugametos* und *Chl. ovalis* mit Nitrat ausgezeichnet wachsen, kann *Chl. reinhardii* nur $NH_4$ verwerten (vgl. auch Cain, 1965).

Tabelle 4. *Quantitative Zusammensetzung der Pigmentgarnitur einiger in N-Mangelnährlösung kultivierter Grünalgen. 8 Tage alte Kultur: noch kein N-Mangel; 35 Tage alte Kultur: N-Mangel; Angaben, falls nichts anders vermerkt, in mg Pigment/g Trockengewicht*

| | *Ankistrodesmus braunii 202-7b* | | *Chlorella fusca 211-8c* | | *Scenedesmus spec. 276-9* | | *Haematococcus pluvialis 114* | | *Chlorella zofingiensis 211-14a* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 8 Tage | 35 Tage | 8 Tage | 35 Tage | 8 Tage | 35 Tage | 8 Tage | 35 Tage | 8 Tage | 35 Tage |
| Chlorophyll a | 12,3 | 0,0 | 11,5 | 0,2 | 15,0 | 2,0 | 8,2 | 0,0 | 9,1 | 0,0 |
| Chlorophyll b | 5,8 | 0,0 | 3,9 | 0,0 | 6,5 | 0,8 | 3,7 | 0,0 | 4,7 | 0,0 |
| α-Carotin | 0,20 | 0,01 | 0,22 | 0,00 | 0,34 | 0,01 | 0,03 | 0,05 | 0,24 | 0,03 |
| β-Carotin | 0,46 | 0,06 | 0,44 | 0,07 | 0,56 | 0,04 | 0,43 | 0,45 | 0,30 | 0,09 |
| Echinenon | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 | 0,20 | 0,00 | 0,00 |
| Canthaxanthin | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,81 | 0,00 | 0,28 | 0,00 | 0,34 | 0,00 | 0,82 |
| Astaxanthin | 0,00 | 1,39 | 0,00 | 0,66 | 0,00 | 0,52 | 0,00 | 1,29 | 0,00 | 1,42 |
| Lutein | 1,80 | 0,63 | 1,91 | 0,64 | 1,50 | 0,82 | 1,53 | 0,73 | 0,73 | 0,30 |
| Violaxanthin | 0,38 | 0,15 | 0,50 | 0,16 | 0,42 | 0,20 | 0,34 | 0,18 | 0,34 | 0,20 |
| Neoxanthin | 0,32 | 0,17 | 0,37 | 0,13 | 0,32 | 0,16 | 0,27 | 0,13 | 0,25 | 0,17 |
| nicht identf. Carot. (ber. als β-Carotin) | 0,03 | 0,06 | 0,03 | 0,08 | 0,00 | 0,12 | 0,07 | 0,18 | 0,00 | 0,10 |
| Gesamt-Carotinoide | 3,19 | 2,47 | 3,47 | 2,55 | 3,14 | 2,48 | 2,67 | 3,55 | 1,86 | 3,13 |
| Trockengewicht (mg/ml) | 0,25 | 0,71 | 0,35 | 1,12 | 0,35 | 0,60 | 1,04 | 1,91 | 0,33 | 1,05 |
| Gesamt-Carot. in Milligramm je 300 ml Kulturlösung | 0,24 | 0,53 | 0,36 | 0,86 | 0,33 | 0,45 | 0,83 | 2,04 | 0,18 | 0,99 |
| Sekundär-Carot. in Milligramm je 300 ml Kulturlösung | 0,00 | 0,30 | 0,00 | 0,49 | 0,00 | 0,20 | 0,00 | 1,05 | 0,00 | 0,71 |

anzusammeln (vgl. Wygasch, 1965, bei *Haematococcus*). Nach etwa 25 Tagen ist in den Zellen Chlorophyll nur noch dünnschichtchromatographisch nachzuweisen. Dem Auge erscheinen sie orange. Gleichzeitig mit der Biogenese der SC setzt die Synthese fetter Öle ein. Es bilden sich relativ große Fettvacuolen, in welche die lipophilen SC nach dem Prinzip des Ausschüttelverfahrens diffundieren. Ob die Oxi-Oxocarotinoide vor oder nach dem Eintreten in die Ölphase verestert werden, läßt sich bisher nicht entscheiden.

Zusammengefaßt verläuft die Verteilung und Lokalisation innerhalb der einzelligen Grünalge vermutlich folgendermaßen: 1. Bildung der SC im Chloroplasten bei N-Mangel. — 2. Diffusion der SC in das umgebende Plasma nach Auflösung der Chloroplastenmembran. — 3. Synchron dazu verlaufende Biogenese von fetten Ölen. — 4. „Ausschüttelung" der SC in die „Fette-Öl-Phase" und Veresterung.

*Faktoren, welche die Bildung der Sekundär-Carotinoide auslösen*

Definitionsgemäß werden SC bei vermindertem Stoffwechsel synthetisiert. Wie vor allem Dersch (1960) (siehe dort weitere Literatur zu dieser Frage) zeigte, können einige Chlorococcalen bei Stickstoffmangel diese Polyene bilden (für *Trentepohlia* vgl. Czygan u. Kalb, 1966). Daß sie von Phosphat-, Schwefel-, Kalium- und Eisenmangelzellen bis zu einem gewissen Grade ebenfalls hergestellt werden, hängt vermutlich mit einer indirekten Hemmung des N-Stoffwechsels zusammen.

Für die Astaxanthinbildung bei Eisenmangel wäre noch eine weitere Erklärung denkbar. Eisenmangel hemmt die Biogenese der Chlorophylle. Hauptsächlich wird die Synthese der $\delta$-Aminolävulinsäure blockiert (Bogorad, 1965, 1966). Das dabei angehäufte Succinat kann jetzt — möglicherweise zusammen mit dem ebenfalls nicht verwertbaren Phytol — zum Aufbau der SC benutzt werden (vgl. unsere Hinweise zur Biosynthese der SC aus Chlorophyllen bei Czygan, 1964b; Kessler u. Czygan, 1965; Czygan u. Kalb, 1966 und im 2. Teil dieser Untersuchung: Czygan, 1968).

Die Synthese der SC beginnt erst, wenn bei N-Mangel die Chlorophylle und zum Teil die primären Carotinoide abgebaut werden (Dersch, 1960; Czygan, 1964b). Abb. 5 zeigt den Abbau der Primärpigmente und den Aufbau der SC am Beispiel von drei Arten der *Chlorococcales*.

Die Art des gebundenen Stickstoffs, mit dem die Organismen vor Eintritt des N-Mangels ernährt werden, scheint, sofern der N dieser Verbindungen assimiliert werden kann, keine Rolle zu spielen. So ernährten wir *Ankistrodesmus braunii 202-7c*, *Chlorella fusca 211-8b* und *Chlorella zofingiensis 211-14a* mit folgenden N-haltigen Substanzen ($10^{-3}$ m berechnet auf N)[4] als einzige N-Quelle und konnten in jedem Fall nach Verbrauch des N SC nachweisen: L(+)-$\beta$-Alanin, Allantoin, p-Aminobenzoesäure, Ammoniumchlorid(-sulfat), L(+)-Asparaginsäure, L(−)-Asparagin, DL-Citrullin, L(+)-Cystein · HCl, L(+)-Glutaminsäure, Glutathion (reduz.), Glycin,

[4] Es wurden jeweils Substanzen (von Merck, Darmstadt, und Serva, Heidelberg) mit dem höchst möglichen Reinheitsgrad verwendet.

Harnsäure, Harnstoff, L-Histidin · HCl, Kreatin, Kreatinin, L-Leucin, Nitrit (K, Na), L-Ornithin, Orotsäure, DL-Phenylalanin, DL-β-Phenylserin, L(−)-Prolin, DL-Serin, L(−)-Threonin, L(−)-Tyrosin, DL-Valin, Xanthin.

Daß tatsächlich der N-Mangel der auslösende Faktor ist, bestätigen folgende Beobachtungen (vgl. auch DERSCH, 1960). Nach Zusatz von N-Quellen zu orangeroten Mangelalgen von *Ankistrodesmus*, *Chlorella* usw. setzt die Regeneration der Chlorophylle und primären Polyene innerhalb von 1—2 Tagen, vor Beginn der erneuten Zellteilung, ein. Die SC verschwinden langsamer. Erst nach etwa 5 Tagen sind sie nicht mehr nachzuweisen.

Ebenso wie DROOP (1955) bei *Haematococcus* und DERSCH (1960) bei einigen Chlorococcalen konnten wir einen prinzipiellen Einfluß der Lichtintensität auf die SC-Bildung nicht feststellen. *Ankistrodesmus braunii* (*202-7a*, *7c*, *7d*), *Chlorella fusca* (*211-8b*, *8c*), *Chlorella zofingiensis* (*211-14a*, *14b*, *14c*), *Scenedesmus obliquus* (*276-3d*, *3e*) und *Haematococcus pluvialis* (*111*, *114*) wurden im Dunkeln mit 0,1—0,2% Glucose, bei 2000 und bei etwa 6000 Lux unter N-Mangel und mit ausreichend N kultiviert. Nur bei N-Mangel bildeten sich *nach* Verbrauch der N-Quelle SC. Zwar wurden im Licht SC schneller als im Dunkeln angereichert. Dies läßt sich jedoch mit dem Einfluß des Lichts auf die Intensität des Stoffwechsels photo-autotropher Pflanzen erklären (vgl. auch CZYGAN u. KALB, 1966).

Im Gegensatz dazu beobachtete KLEINIG (1966), daß die Siphonale *Acetabularia mediterranea* am natürlichen Standort an lichtexponierten Stellen rot und an schattigen Fundorten grün ist. In beiden Fällen war die Versorgung mit Nährstoffen gleich. Ob es sich hier tatsächlich um eine direkte Abhängigkeit der SC-Biogenese von der Beleuchtungsintensität handelt, müssen Laborversuche zeigen. Möglicherweise hemmt die intensive Bestrahlung in irgendeiner Weise die Nährstoffaufnahme und bedingt damit einen Mangelzustand.

Durch Erhöhung der normalen Kultivierungstemperatur von 21°C auf 35°C konnte die qualitative Zusammensetzung der SC von *Ankistrodesmus braunii* (*202-7a*, *7c*, *7d*), *Chlorella fusca* (*211-8b*, *8c*), *Chlorella zofingiensis* (*211-14a*, *14b*, *14c*) und *Scenedesmus obliquus* (*276-3d*) nicht verändert werden.

Eingehend untersuchten wir den Einfluß von Kohlenhydraten (unter anderem Glucose, Galaktose: $1—3 \cdot 10^{-2}$ m) und von organischen Säuren (Acetat, Pyruvat, Succinat: $2 \cdot 10^{-3}$ m bis $2 \cdot 10^{-2}$ m) auf die Bildung der SC von *Ankistrodesmus braunii 202-7c* und von *Chlorella fusca 211-8b* (vgl. den 2. Teil dieser Untersuchung: CZYGAN, 1968). Wie bereits an anderen Objekten gezeigt werden konnte (unter anderem BERGMANN, 1955; DERSCH, 1960; DVOŘÁKOVÁ-HLADKÁ, 1966), erhöhen diese Substanzen die Wachstumsrate. Kann mit diesem verstärkten Wachstum

die N-Versorgung Schritt halten (Erhöhung der Nitratkonzentration auf das Doppelte, Zusatz von 0,5% Pepton), so werden in Gegenwart von Glucose und Galaktose die Konzentrationen (mg Pigment/g Trockengewicht) der Chlorophylle nicht wesentlich verändert und die der primären Carotinoide um etwa 40% erhöht (vgl. auch Myers, 1940). Mit Acetat, Pyruvat und Succinat steigen die primären Polyenkonzentrationen gegenüber den Kontrollen um 10—20% an. In Mangelkulturen beeinflußt dagegen keine dieser Substanzen den Gehalt an SC. Allerdings setzt, bedingt durch das schnellere Wachstum und damit durch den rascheren Verbrauch des N, der N-Mangel und damit die Synthese der SC früher ein.

So läßt sich auch die Beobachtung von Di Accadia u. Mitarb. (1966) deuten, daß *Dictyococcus cinnabarinus* nach Zusatz von Glucose rot wird (vgl. Chodat, 1913; 1938). Ernährten wir diesen Organismus mit Glucose (0,1—0,9%), mit Nitrat ($10^{-2}$ m) und mit Pepton (0,5%), so konnten wir trotz guten Wachstums der Kulturen *vor* Verbrauch der N-Quellen keine SC nachweisen. Auch die Isolierung von Echinenon in „normalen" *Haematococcus pluvialis* (Goodwin u. Jamikorn, 1954) läßt sich vermutlich auf das Fehlen optimaler N-Versorgung zurückführen (zu den Stigmata-Carotinoiden vgl. S. 93). Kultivierten wir von *H. pluvialis* die Stämme 34-1c, 111 und 114 in Lösung 1, waren die Algen frei von SC. Allerdings gelang es uns nicht, *Chlorococcum wimmeri 213-4* SC-frei heranzuziehen (Czygan u. Kessler, 1967). Wir nehmen an, und die bis zu 3 Wochen lange Lag-Phase vom Überimpfen der Algen bis zum Beginn des Wachstums scheint es zu bestätigen, daß trotz ausreichender Stickstoff-Versorgung ein „physiologischer N-Mangel" besteht. Möglicherweise hemmen unbekannte Faktoren die Aufnahme und Verwertung des angebotenen Stickstoffs. Unsere Versuche mit *Chlorella zofingiensis* beweisen, daß solche „physiologischen Mangelbedingungen" auftreten können. Nur bei pH 7,0 bis pH 8,0 bildet diese Alge unter Normalbedingungen keine SC. Bereits bei pH 6,5 bis zur Wachstumsgrenze von etwa pH 5,0 werden trotz ausreichender N-Versorgung nur 1/50 des bei pH 7,0 vorhandenen Chlorophylls, dafür aber große Mengen (etwa 2 mg/g Trockengewicht) Astaxanthin und Canthaxanthin gebildet (Kessler u. Czygan, 1965).

Nach kinetischen Untersuchungen zur SC-Bildung (Abb. 5) wird in Stämmen mit zwei oder drei Ketocarotinoiden nicht das am wenigsten oxidierte Polyen (Echinenon), sondern das sauerstoffreichste (Astaxanthin) zuerst synthetisiert. Wie wir in Versuchen mit Mutanten und Revertanten an anderer Stelle dieser Untersuchungen zeigen konnten (Czygan, 1968), entstehen das Mono- und das Dioxoderivat des $\beta$-Carotins entweder durch Reduktion des Astaxanthins oder nach Oxidation des sekundär gebildeten $\beta$-Carotins. Echinenon erscheint in den

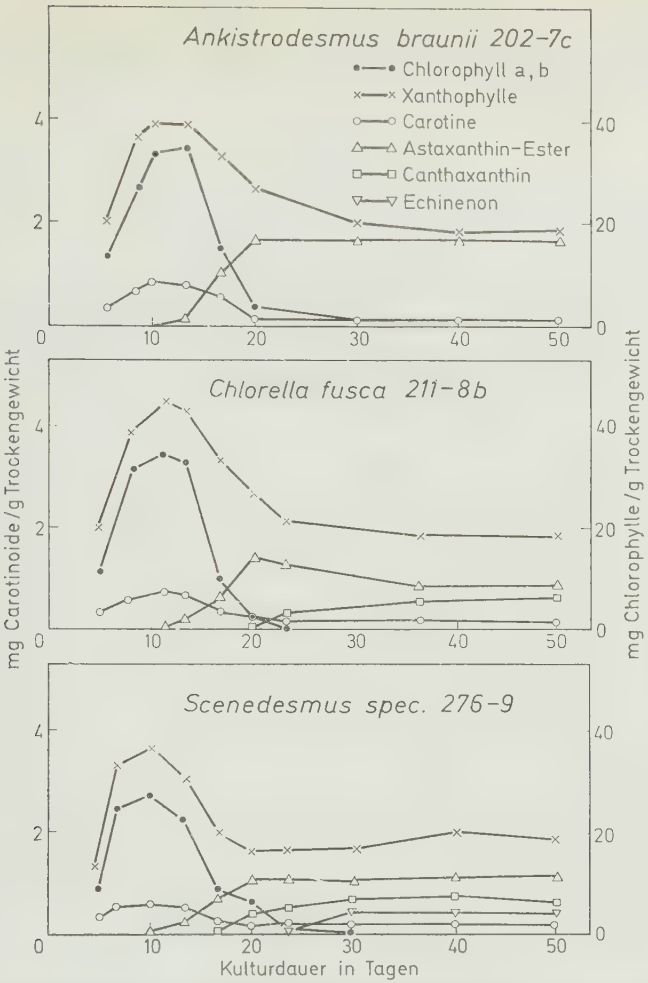


Abb. 5. Auf- und Abbau der primären und sekundären Pigmente in Stickstoffmangel-Kulturen verschiedener Chlorococcalen

N-Mangelalgen immer erst nach dem Canthaxanthin und Astaxanthin, Canthaxanthin erst nach dem Astaxanthin. Eine Ausnahme macht *Chlorococcum wimmeri 213-4*. Hier sind bereits zu Beginn des Wachstums Astaxanthin, 3-Oxi-4,4′-dioxo-$\beta$-carotin, Canthaxanthin und Echinenon nebeneinander nachzuweisen (Czygan u. Kessler, 1967).

Herrn Prof. Dr. E. Kessler bin ich für anregende Diskussionen sehr zu Dank verpflichtet. Mein Dank gebührt weiter Herrn Prof. Dr. H. J. Bestmann für Hinweise zur Chemie der Carotinoide, Frau C. Zimmermann und Frau R. Hellmann für sorgfältige Anzucht der Algen, Herrn Dr. O. Isler und Herrn Dr. H. Thommen

(F. Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel) sowie Herrn Prof. Dr. B. C. L. Weedon (London) für authentische Carotinoide, Herrn Dr. W. Koch (Göttingen) für die mir zur Verfügung gestellten Algen sowie für Ratschläge zu ihrer Anzucht und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen.

## Literatur

Allen, M. B.: List of cultures maintained by the Laboratory of Comparative Biology, Kaiser Foundation Research Institute. Bethesda, Maryland, U.S.A. 1963.

Anonymus: List of strains. Culture collection of algae and protozoa. University of Cambridge. Cambridge: The Botanical School 1966.

Bergmann, L.: Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung. Flora (Jena) **142**, 493—539 (1955).

Bogorad, L.: Chlorophyll biosynthesis. In: T. W. Goodwin (Ed.): Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, pp. 29—74. London-New York: Academic Press 1965.

— The biosynthesis of chlorophylls. In: L. P. Vernon and G. R. Seely (Eds.): The Chlorophylls, pp. 481—510. London-New York: Academic Press 1966.

Bold, H. C., and B. C. Parker: Some supplementary attributes to the classification of *Chlorococcum* species. Arch. Mikrobiol. **42**, 267—288 (1962).

Cain, B. J.: Nitrogen utilization in 38 freshwater chlamydomonad algae. Canad. J. Bot. **43**, 1367—1378 (1965).

Chodat, F.: Études sur la genèse des caroténoides. Arch. Sci. Phys. Nat. Genève **20**, 98—114 (1938).

Chodat, R.: Monographies d'algues en culture pure. Beitr. Kryptogamenflora. Schweiz **4**, H. 2 (1913).

Czygan, F.-C.: Canthaxanthin als Sekundär-Carotinoid einiger Grünalgen. Experientia (Basel) **20**, 573 (1964a).

— Untersuchungen über die Wirkung von Chloramphenicol auf den Auf- und Abbau der Pigmente einiger Grünalgen. Arch. Mikrobiol. **47**, 251—259 (1964b).

— Echinenon als Sekundär-Carotinoid einiger Grünalgen. Z. Naturforsch. **21b**, 197—198 (1966).

— Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. II. Untersuchungen zur Biogenese. (In Vorbereitung.) (1968).

—, u. K. Kalb: Untersuchungen zur Biogenese der Carotinoide in *Trentepohlia aurea*. Z. Pflanzenphysiol. **55**, 59—64 (1966).

—, u. E. Kessler: Nachweis von 3-Oxi-4,4′-dioxo-$\beta$-carotin in den Grünalgen *Chlorococcum wimmeri* und *Haematococcus* spec. Z. Naturforsch. **22b**, 1085—1086 (1967).

—, u. H. Ranneberg: Ketocarotinoide in Dauerformen verschiedener Grünalgen. (In Vorbereitung) (1968).

Davies, B. H.: Analysis of carotenoid pigments. In: T. W. Goodwin (Ed.): Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, pp. 489—532. London-New York: Academic Press 1965.

Dersch, G.: Mineralsalzmangel und Sekundärcarotinoide in Grünalgen. Flora (Jena) **149**, 566—603 (1960).

Di Accadia, F. D., O. Gribanovski-Sassu, A. Romagnoli, and L. Tuttobello: Isolation and identification of carotenoids produced by a green alga (*Dictyococcus cinnabarinus*) in submerged culture. Biochem. J. **101**, 735—740 (1966).

Droop, M. R.: Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*. Nature (Lond.) **175**, 42 (1955).

Dvořáková-Hladká, J.: Utilization of organic substrates during mixotrophic and heterotrophic cultivation of algae. Biologia Plantarum (Praha) 8, 354—361 (1966).

Egger, K.: Dünnschichtchromatographie der Chloroplastenpigmente. Planta (Berl.) **58**, 664—667 (1962).

—, u. H. Kleinig: Die Ketocarotinoide in *Adonis annua* L.-III. Vergleich mit synthetischen Substanzen. Phytochem. **6**, 903—905 (1967).

—, u. H. Voigt: Carotinoidtrennung an Polyamid-Dünnschichten. Z. Pflanzenphysiol. **53**, 64—71 (1965).

Fox, D. L., and M. C. Sargent: Chem. and Ind. **57**, 1111 (1938); zit. nach Goodwin (1952).

Goodwin, T. W.: Comparative Biochemistry of the Carotenoids. London: Chapman and Hall 1952.

— Carotenoids. In: K. Paech u. M. V. Tracey (Hrsg.): Moderne Meth. d. Pflanzenanalyse, Bd. 3, Sp. 272—311. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

— The plastid pigments of flagellates. In: S. H. Hutner (Ed.): Biochemistry and Physiology of Protozoa, Vol. 3, pp. 319—339. London-New York: Academic Press 1964.

—, and M. Jamikorn: Studies in carotenogenesis. 11. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. Biochem. J. **57**, 376—381 (1954).

Green, J.: The occurrence of astaxanthin in the euglenoid *Trachelomonas volvocina*. Comp. Biochem. Physiol. **9**, 313—316 (1963).

Hager, A., u. T. Bertenrath: Verteilungschromatographische Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden grüner Pflanzen an Dünnschichten. Planta (Berl.) **58**, 564—568 (1962).

—, u. T. Meyer-Bertenrath: Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden. Planta (Berl.) **69**, 198 bis 217 (1966).

Hutner, S. H., L. Provasoli, and J. Filfus: Nutrition of some phagotrophic fresh-water chrysomonads. In: R. W. Miner (Ed.): Growth of Protozoa. Ann. N.Y. Acad. Sci. **56**, 852—862 (1953).

Isler, O., u. P. Schudel: Synthese und Markierung von Carotinen und Carotinoiden. In: K. Lang (Hrsg.): Carotine und Carotinoide, S. 54—103. Darmstadt: Steinkopff 1963.

Jeffrey, S. W.: Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. Biochem. J. **80**, 336—342 (1961).

Karrer, P., u. E. Jucker: Carotinoide. Basel: Birkhäuser 1948.

Kessler, E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. III. Merkmale von 8 autotrophen Arten. Arch. Mikrobiol. **55**, 346 bis 357 (1967).

—, u. F.-C. Czygan: *Chlorella zofingiensis* Dönz: Isolierung neuer Stämme und ihre physiologisch-biochemischen Eigenschaften. Ber. dtsch. bot. Ges. **78**, 342—347 (1965).

— — Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattungen *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus*. I. Hydrogenase, Sekundär-Carotinoide und Gelatine-Verflüssigung. Arch. Mikrobiol. **55**, 320—326 (1967).

— — B. Fott u. M. Nováková: Über *Halochlorella rubescens* Dangeard. Arch. Protistenk. (im Druck) (1968).

— W. Langner, I. Ludewig u. H. Wiechmann: Bildung von Sekundär-Carotinoiden bei Stickstoffmangel und Hydrogenase-Aktivität als taxonomische Merkmale in der Gattung *Chlorella*. Microalgae and Photosynthetic Bacteria, pp. 7—20. Tokyo 1963.

Kleinig, H.: Die Bildung von Sekundärcarotinoiden in *Acetabularia mediterranea*. Ber. dtsch. bot. Ges. **79**, (126)—(130) (1966).
— Sekundärcarotinoide der Grünalge *Sphaeroplea*. Z. Naturforsch. **22**b, 977—979 (1967).
—, u. K. Egger: Ketocarotinoidester in *Acetabularia mediterranea* Lam. Phytochem. **6**, 611—619 (1967).
Klenk, E., W. Knipprath, D. Eberhagen u. H. P. Koof: Über die ungesättigten Fettsäuren der Fettstoffe von Süßwasser- und Meeresalgen. Hoppe-Seylers. Z. physiol. Chem. **334**, 44—59 (1963).
Koch, W.: Verzeichnis der Sammlung von Algenkulturen am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen. Arch. Mikrobiol. **47**, 402—432 (1964).
Krinsky, N. I., and T. H. Goldsmith: The carotenoids of the flagellated alga, *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. **91**, 271—279 (1960).
—, and R. P. Levine: Carotenoids of wild type and mutant strains of the green alga, *Chlamydomonas reinhardi*. Plant Physiol. **39**, 680—687 (1964).
Kuhn, R., u. N. A. Sörensen: Über Astaxanthin und Ovoverdin. Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1879—1888 (1938).
Links, J., A. Verloop, and E. Havinga: The carotenoids of *Polytoma uvella*. Arch. Mikrobiol. **36**, 306—324 (1960).
McLean, R.: Primary and secondary carotenoids of *Spongiochloris typica*. Physiol. Plantarum (Copenh.) **20**, 41—47 (1967).
Myers, J.: A study of the pigments produced in darkness by certain green algae. Plant Physiol. **15**, 575—588 (1940).
Neeb, O.: *Hydrodictyon* als Objekt einer vergleichenden Untersuchung physiologischer Größen. Flora (Jena) **139**, 39—95 (1952).
Pringsheim, E. G.: Farblose Algen. Stuttgart: Fischer 1963.
Richter, G.: Das Verhalten der Plastidenpigmente in kernlosen Zellen und Teilstücken von *Acetabularia mediterranea*. Planta (Berl.) **52**, 259—275 (1958).
Röbbelen, G.: Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-L. 88, 189 bis 252 (1957).
Šesták, Z., and O. Baslerová: Changes in chlorophylls and carotenoids in ageing cultures of green algae as studied by paper chromatography. Microalgae and Photosynthetic Bacteria, pp. 423—429. Tokyo 1963.
Starr, R. C.: The culture collection of algae at Indiana University. Amer. J. Bot. **51**, 1013—1044 (1964).
Tischer, J.: Über die Identität von „Euglenarhodon" mit Astacin. (Carotinoide der Süßwasseralgen, VIII. Teil). Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **267**, 281—284 (1940).
— Über die Carotinoide von *Haematococcus pluvialis*. III. (Carotinoide der Süßwasseralgen, IX. Teil.) Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **281**, 143—155 (1944).
Viala, G.: L'astaxanthine chez le *Chlamydomonas nivalis* Wille. C. R. Acad. Sci. (Paris), Ser. D, 1383—1386 (1966).
Weedon, B. C. L.: Chemistry of the carotenoids. In: T. W. Goodwin (Ed.): Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, pp. 75—125. London-New York: Academic Press 1965.
— Some studies on carotenoid synthesis. Pure appl. Chem. **14**, 265—278 (1967).
Wygasch, J.: Der rote Farbstoff der Blutregenalge. Mikrokosmos **54**, 8—12 (1965).

Priv.-Doz. Dr. Franz-Christian Czygan
Botanisches Institut der Universität
8520 Erlangen, Schloßgarten 4

Archiv für Mikrobiologie 62, 209–236 (1968)

# Sekundär-Carotinoide in Grünalgen

## II. Untersuchungen zur Biogenese

Franz-Christian Czygan

Botanisches Institut der Universität, Erlangen

Eingegangen am 29. März 1968

### *Secondary Carotenoids in Green Algae*

### *II. Studies on Biogenesis*

*Summary.* 1. Biogenesis of secondary carotenoids (SC) has been studied with special reference to species of the genera *Ankistrodesmus*, *Chlorella*, and *Scenedesmus*. The biosynthesis of SC differs from that of the primary carotenoids. There is a close connection between the production of these oxopolyenes and the decomposition of the chlorophylls. According to our working hypothesis, decomposition products of chlorophyll or precursors of its biogenesis may act as precursors of SC. The following facts support this conclusion.

2. The production of SC runs synchronously with the decomposition of chlorophylls.

3. The original concentration of chlorophylls is usually sufficient for the formation of SC, there may be used the phytol as well as the porphyrin ring.

4. Green algae are able to assimilate the nitrogen of derivatives of porphyrins, pyrrols, and indols.

5. After an increase of chlorophyll concentration in the cells, caused by a better supply with iron, also the amount of SC increases under conditions of nitrogen deficiency.

6. Under iron-deficient conditions precursors of chlorophyll synthesis may be accumulated and used for the production of SC.

7. Chloramphenicol which inhibits chlorophyll decomposition and SC synthesis, blocks the first process only. Nitrogen-deficient cultures of *Chlorella zofingiensis*, poor in chlorophylls and rich in SC, are influenced by chloramphenicol to small extent only. In this species formation of chlorophylls depends on pH; below pH 6.0 it is inhibited. Under these conditions, precursors are perhaps accumulated and used for the synthesis of SC.

8. By means of a partial inhibition by chloramphenicol of chlorophyll formation, we have been able to identify pheophytin and hematoporphyrin as possible links in the chain of reactions leading from chlorophylls to SC.

9. These and some further unidentified derivatives of porphyrin have been found in mutants of *Ankistrodesmus braunii* which did not form SC.

10. Autotrophic and heterotrophic green mutants of *Ankistrodesmus*, *Chlorella*, and *Scenedesmus* are neither bleached completely nor do they synthesize SC under nitrogen-deficient conditions.

11. Heterotrophic and apochlorotic algal strains, i.e. *Hyaloraphidium* and *Prototheca* descending from *Ankistrodesmus* and *Chlorella*, as well as all studied white and yellow mutants of *Chlorella* and *Ankistrodesmus* are unable to form SC.

12. Some heterotrophic mutants show a stepwise reversion to the wild type after addition of chloramphenicol to the culture medium. Intermediate stages of

this process have been isolated. There is a close connection between the ability to form and to decompose chlorophylls and the property of synthesize SC.

13. These facts have been discussed with regard to our working hypothesis that phytol or/and the porphyrinring of chlorophyll may act as precursors of SC. A scheme for the transformation of porphyrin to SC has been proposed.

*Zusammenfassung.* 1. In der vorliegenden Arbeit wird die Biogenese der Sekundär-Carotinoide (SC) der Chlorococcalen-Gattungen *Ankistrodesmus*, *Chlorella* und *Scenedesmus* näher untersucht. Die SC werden abweichend von den primären Carotinoiden synthetisiert. Nach unserer Hypothese sind Abbauprodukte der Chlorophylle normalerweise Vorstufen der SC. Folgende Ergebnisse sprechen für diese Annahme.

2. Der Aufbau der SC erfolgt parallel zum Abbau der Chlorophylle.

3. Unabhängig davon, ob Phytol oder/und Porphyrin-Derivate als Vorstufen anzusehen sind, steht für den Aufbau der SC genügend Chlorophyll zur Verfügung.

4. Grünalgen können Porphyrin-, Pyrrol- und Indol-Derivate als N-Quelle verwenden.

5. Bei einer Erhöhung der Chlorophyllkonzentration in den Kulturen (z. B. durch bessere Fe-Versorgung der Algen) wird unter Mangelbedingungen auch der Gehalt an SC vergrößert.

6. Bei Fe-Mangel werden Vorstufen der Chlorophyllsynthese angereichert und für den Aufbau der SC benutzt.

7. Chloramphenicol (CAP) hemmt nicht den Aufbau der primären Polyene und der Chlorophylle, dagegen den Abbau der grünen Pigmente und damit den Aufbau der SC.

8. Der eigentliche durch CAP blockierte Prozeß ist der Chlorophyllabbau. In chlorophyllarmen und an SC reichen Kulturen von *Chlorella zofingiensis* wird der Aufbau der SC nur unwesentlich beeinflußt.

9. In dieser Alge ist die Chlorophyllsynthese pH-Wert-abhängig. Bei einem pH-Wert unter 6,0 wird sie gehemmt, Vorstufen werden vermutlich angereichert und in die SC eingebaut.

10. Bei partieller Hemmung des Chlorophyllabbaus durch CAP sind Phäophytin und Hämatoporphyrin als mögliche Zwischenstufen der Kette Chlorophylle → SC zu finden.

11. Diese und andere nicht näher identifizierte Porphyrine lassen sich auch in *Ankistrodesmus*-Mutanten, die nicht zur SC-Bildung fähig sind, nachweisen.

12. Autotrophe und heterotrophe grüne *Ankistrodesmus*-, *Chlorella*- und *Scenedesmus*-Mutanten, die bei N-Mangel nicht völlig ausbleichen, können keine SC bilden.

13. Heterotrophe, apochlorotische Grünalgen wie *Hyaloraphidium* und *Prototheca*, die vermutlich von autotrophen, zum Teil zur SC-Bildung befähigten Arten (*Ankistrodesmus* bzw. *Chlorella*) abstammen, bilden ebenso wie alle untersuchten weißen und gelben Mutanten von *Chlorella* und *Ankistrodesmus* keine SC.

14. Einige farblose Mutanten revertieren nach Zusatz von CAP in den untersuchten Eigenschaften zum Wildtyp. Zwischenphasen der Reversion konnten isoliert werden. Erst nach Zurückgewinnung der Fähigkeit zur Chlorophyllsynthese revertieren die Algen zu Formen, die SC bilden können.

15. An Hand dieser Ergebnisse werden verschiedenen Möglichkeiten der Biogenese der SC ($C_{40}$) aus Phytol ($C_{20} + C_{20}$) oder aus Porphyrinderivaten ($C_5 + C_{10} + C_{10} + C_{10} + C_5$) diskutiert.

Bei Stickstoffmangel werden in verschiedenen Grünalgen die Chlorophylle und zum Teil die primären Carotinoide (bei den Chlorococcalen:

vor allem α- und β-Carotin, Lutein, Luteinepoxid, Violaxanthin, Neoxanthin) abgebaut und Sekundär-Carotinoide[1] (insbesondere Oxoderivate des β-Carotins) gebildet (Czygan, 1968).

In der vorliegenden Untersuchung sollen die Biogenesewege der SC hauptsächlich am Beispiel der Chlorococcalen-Gattungen *Ankistrodesmus*, *Chlorella* und *Scenedesmus* verfolgt werden.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die SC durch Reduktion bzw. Oxydation der primären Carotinoide entstehen. Weiterhin wäre es denkbar, daß die SC bei N-Mangel aus den gleichen Vorstufen gebildet werden, die unter normalen Bedingungen (genügend N) zur Synthese der primären Polyene führen. Dann müßte die Biogenese der SC dem allgemein postulierten, aber im einzelnen für Tetraterpene noch nicht gesicherten Terpenoidschema folgen (vgl. Zusammenfassung bei Czygan, 1967). Eine dritte Möglichkeit bietet die Überlegung, daß zwar die Untereinheiten, die zu den SC verknüpft werden, denen der primären Carotinoide entsprechen, daß aber die Herkunft dieser Vorstufen bei beiden Carotinoidtypen verschieden ist.

Bereits Dersch (1960) wies auf einige Tatsachen hin, die sowohl gegen eine direkte Bildung der SC aus primären Carotinoiden als auch gegen die Benutzung desselben Vorstufenpools sprechen (vgl. auch Šesták u. Baslerová, 1963).

So verläuft die Biogenese beider Pigmenttypen unterschiedlich schnell. Außerdem werden nach den heutigen Vorstellungen in der Carotinoidforschung (Williams u. Mitarb., 1967) Derivate des α-Carotins nicht in solche des β-Carotins umgewandelt. Die SC sind jedoch Oxoverbindungen des β-Carotins, die hauptsächlichen primären Polyene dagegen Oxi-α-carotine (z. B. Lutein). Weiterhin reicht die abgebaute Menge der primären Carotinoide, besonders die des β-Carotins und seiner Derivate (Violaxanthin, Neoxanthin), nicht aus, um die gefundenen SC-Konzentrationen zu erklären (vgl. Czygan, 1968; Tab. 4). Außerdem wird in Eisenmangelzellen schon zu Beginn der Kultur Astaxanthin neben den primären Carotinen und Xanthophyllen gebildet. Auch diese Beobachtung weist auf einen fehlenden direkten biogenetischen Zusammenhang zwischen primären und sekundären Carotinoiden hin. Wie wir zeigen konnten, wird durch Chloramphenicol der Aufbau der Chlorophylle und primären Carotinoide nicht oder nur wenig, dagegen der Abbau dieser Pigmente und die Biogenese der SC stark gehemmt (Czygan, 1964a). Verliefe die Biogenese beider Farbstofftypen übereinstimmend, müßte sie in beiden Fällen in gleicher Weise gestört werden. Auch die von uns bestätigte Beobachtung von Dersch (1960), daß nach Zusatz

[1] Abkürzungen: SC = Sekundär-Carotinoide; CAP = Chloramphenicol; dc = dünnschichtchromatographisch; EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure, Na-Salz (Titriplex III, Merck).

von Glucose zu N-Mangelkulturen von *Ankistrodesmus braunii 202-7c* zwar der Gehalt an primären Carotinoiden erhöht wird, jedoch die Konzentration der SC gleich bleibt, gelegentlich sogar etwas erniedrigt wird, spricht gegen eine übereinstimmende Biogenese der primären und sekundären Polyene.

Diese Tatsachen ließen uns nach einer speziellen Ausgangssubstanz für die Bildung der SC suchen. Auffallend ist der synchrone Verlauf von Chlorophyllabbau und SC-Aufbau. Nach unseren bisherigen Ergebnissen (Czygan, 1964a; Kessler u. Czygan, 1965, 1966; Czygan u. Kalb, 1966) stellen wir die Hypothese auf, daß Abbauprodukte des Chlorophylls, möglicherweise Phytol und Porphyrinderivate, gelegentlich aber auch Vorstufen der Chlorophyllsynthese, Präcursoren der SC sind.

Im ersten Teil der folgenden Untersuchungen sollen die biochemisch-physiologischen Beziehungen zwischen dem Chlorophyllabbau und dem SC-Aufbau erörtert werden. Im zweiten Teil stehen Versuche zur Charakterisierung der Zwischenprodukte der postulierten Reaktionskette Chlorophylle → SC im Vordergrund.

## 1. Material und Methodik

Einige der für diese Untersuchungen verwendeten Algen und ihre Kultur wurden bereits im ersten Teil dieser Arbeit aufgeführt (Czygan, 1968). Zusätzlich standen uns folgende Mutanten zur Verfügung:

1. 38 UV-Mutanten von *Chlorella fusca (C·1.1.10)* aus der Algensammlung des Kaiser Foundation Research Institute, Richmond, California/USA (jetzt: Bethesda, Maryland/USA). Diese Mutanten sind von Bendix u. Allen (1962) beschrieben und von uns für biochemisch-physiologische Versuche bereits benutzt worden (vgl. Kessler u. Czygan, 1966).

2. Die UV-Mutanten von *Chlorella fusca* Nr. *211-8o* und *211-8n* aus der Algensammlung Pringsheim, Göttingen (Koch, 1964). Diese Formen wurden von Butler (1954) isoliert (vgl. auch Ciferri, 1957).

3. Drei UV-Mutanten von *Chlorella fusca 211-8b* (*M-301*, *M-304*, *M-308*) aus der Sammlung von P. Schwarze (Köln). Diese Stämme bilden bereits unter Normalbedingungen (vgl. S. 224) Ketocarotinoide. Zur Auslösung der Mutationen wurde eine Suspension des Wildstamms in einer offenen Petrischale mit einem 50 cm entfernten Osram-Entkeimungsstrahler HNS12 6 min lang bestrahlt (P. Schwarze, briefliche Mitteilung).

4. Eine UV-Mutante von *Scenedesmus obliquus 276-3d* (= *M-SC/1*).

5. Zehn UV-Mutanten von *Ankistrodesmus braunii 202-7c* (= *M-A/1* bis *M-A/10*).

Die *Scenedesmus*- und *Ankistrodesmus*-Mutanten stellten wir folgendermaßen her. Petrischalen mit Glucose-Pepton-Hefe-Agar (Lösung 3 + 2% Agar) beschickten wir mit einer dünnen Suspension der Wildtypen (10 Tage alt; in Lösung 1 kultiviert) und bestrahlten sie 10 min im Abstand von ca. 25 cm mit einer Entkeimungslampe (Philips TUV 30 W). Anschließend kultivierten wir die Algen auf den Petrischalen im Dauerlicht bei ca. 20° C weiter. Nach 10—20 Tagen waren einzelne Kolonien deutlich zu erkennen. Jetzt wurden alle Kulturen nach der Lederbergschen Stempelmethode (Lederberg u. Lederberg, 1952) auf N-Mangel-Agar (Lösung 2 + 2% Agar) und auf anorganischen Normalagar (Lösung 1 + 2% Agar)

Tabelle 1. *Einige Eigenschaften und Merkmale der* Scenedesmus- *und* Ankistrodesmus-*Mutanten (vgl. Material und Methodik)*

| Nr. der Mutante | Normal-Kultur | N-Mangel-Kultur | Pigmentierung | |
|---|---|---|---|---|
| | kultiviert in | | in Normal-Kultur | in N-Mangel-Kultur |
| *M-Sc/1* (stabile M.) (wächst *nicht autotroph*) | Lösung 1 + 0,2% Glucose + 0,3% Hefeextrakt | Lösung 2 + 0,2% Glucose + 0,3% Hefeextrakt | wenig Chl.a + b; Chl.-Derivate; prim.C. | wie in Normalkultur, aber verstärkt Chl.-Derivate; keine SC |
| *M-A/1* (instabile M.) (wächst *autotroph*) | Lösung 1 | Lösung 2 | normal (vgl. Tab. 4 bei Czygan, 1968) | Chl.a + b auf ca. $^1/_3$ reduziert; Chl.-Derivate; prim.C.; keine SC |
| *M-A/2* (instabile M.) (wächst *autotroph*) | Lösung 1 (wächst um etwa $^1/_3$ langsamer als der Wildtyp) | Lösung 2 | normal (vgl. Tab. 4 bei Czygan, 1968) | Chl.a + b auf $^1/_2$ reduziert; Chl.-Derivate; prim.C.; keine SC |
| *M-A/3,4,6* (stabile M.) (wachsen *nicht autotroph*) | Lösung 3 | Lösung 4 | kein Chl.a + b und keine gefärbten Carotinoide; Phytoen und Phytofluen | wie in Normal-Kultur |
| *M-A/5* (instabile M.) (wächst *nicht autotroph*) | Lösung 3 | Lösung 4 | kein Chl.a + b; prim.C. | wie in Normal-Kultur |
| *M-A/7-10* (instabile M.) (wachsen *nicht autotroph*) | Lösung 3 | Lösung 4 | wenig Chl.a + b; Chl.-Derivate; prim.C. | wie in Normal-Kultur, aber verstärkt Chl.-Derivate; prim.C.; keine SC |

Chl. = Chlorophyll; prim.C. = primäre Carotinoide; SC = Sekundär-Carotinoide; M = Mutation.

übertragen. Es war unser Ziel, erstens heterotrophe und autotrophe Formen zu isolieren, die bei N-Mangel keine SC bilden, und zweitens Mutanten zu finden, die bereits unter Normalbedingungen SC synthetisieren. Vertreter der letzten Gruppe erhielten wir nicht. Auffallenderweise und im Gegensatz zu den übrigen Mutanten waren *M-A/1, 2, 5. 7, 8, 9* und *10* nicht sehr stabil. In diesen Kulturen waren Reversionen zum Wildtyp häufig. Von den bisher näher untersuchten Mutanten sind 11 in Tab. 1 mit einigen ihrer Eigenschaften aufgeführt.

Die Anzucht der Mutanten erfolgte, falls nicht anders angegeben, nach den bereits beschriebenen Kulturbedingungen (Czygan, 1968). Weitere methodische Angaben finden sich im ersten Teil dieser Untersuchungen (Czygan, 1968) oder an den entsprechenden Textstellen.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### *Biochemisch-physiologische Untersuchungen*

#### Versuche zur Assimilation N-haltiger Heterocyclen

Grundvoraussetzung unserer Hypothese muß die Fähigkeit der Algen sein, Chlorophyllderivate ab- und umzubauen. Von höheren Pflanzen ist dieser Vorgang bekannt. Zum Beispiel werden in den herbstlichen Laubblättern die Chlorophylle katabolisiert. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist jedoch der Weg des Abbaus bis heute noch nicht geklärt. Möglicherweise wird zuerst Phytol abgespalten und anschließend das Chlorophyllid nach Entfernen des Mg über Chlorine in kleinere Bruchstücke zerschlagen (vgl. unter anderen Egle, 1960 b; Chichester u. Nakayama, 1963). Auch viele Grünalgen bleichen bei vermindertem Wachstum aus (Pringsheim, 1963; Kessler u. Mitarb., 1963).

Für unsere Vorstellungen war es daher wichtig zu prüfen, ob Grünalgen N-haltige Pentacyclen wie Porphyrin-, Pyrrol- und Indolderivate als einzige N-Quelle benutzen können. Aus dem beobachteten Wachstum (Tab. 2) mußten wir auf das Vermögen dieser Algen schließen, Heterocyclen aufzubrechen und den Stickstoff zu assimilieren. Die negativen Ergebnisse mit einigen Porphyrinderivaten lassen sich wahrscheinlich mit fehlender Permeabilität der Zellmembran für diese Substanzen erklären. In weiteren Versuchen setzten wir die assimilierbaren Heterocyclen als einzige N-Quelle orangeroten N-Mangelkulturen der oben erwähnten zwei Arten zu. Die Kulturen ergrünten. Der Stickstoff wurde also ebenfalls verwendet.

#### Versuche zur Erhöhung und zur Verminderung der Chlorophyll- und damit der SC-Konzentration

Die Biogenese des Chlorophylls ist Fe-abhängig (Bogorad, 1965, 1966). Da die Versorgung unserer Algenkulturen mit diesem Element nicht optimal ist, versuchten wir, die Ausnutzung des vorhandenen Fe durch Zusatz von EDTA zu verbessern (vgl. Kessler, 1968; Kessler u. Czygan, 1968). In N-Mangelkulturen ist jedoch N begrenzender Faktor. Chlorophylle und Proteine werden bei ihrer Synthese um den

Tabelle 2. *Verwertbarkeit verschiedener Chlorophyll-, Porphyrin-, Pyrrol- und Indolderivate als einzige N-Quelle durch* Ankistrodesmus braunii 202-7 c *und* Chlorella fusca 211-8 b

Kulturen 60 Tage alt; in den einzelnen Versuchsansätzen wurde das $KNO_3$ der Kontrollen (Lösung 2) durch die entsprechenden Konzentrationen an N-Heterocyclen (berechnet auf N) sowie durch äquivalente Mengen KCl ersetzt; das Wachstum ist in Prozent der Kontrollen (1,12 mg — für *202-7 c* — bzw. 0,92 mg — für *211-8 b* — Trockensubstanz je Milliliter Kulturlösung) angegeben. Die Chlorophyll- und Porphyrinderivate wurden der sterilisierten Nährlösung aseptisch mit etwas Tween 80 als Lösungsvermittler zugesetzt

| Substanz | *Ankistrodesmus* % | *Chlorella* % |
|---|---|---|
| Phäophytin a [a] | 23 | 20 |
| Phäophytin b [a] | 18 | 25 |
| Methylphäophorbid a [a] | 12 | 15 |
| Methylphäophorbid b [a] | 9 | 12 |
| Hämatoporphyrin [b] · HCl [c] | 0 | 0 |
| Pyrroporphyrin [b] | 0 | 0 |
| Rhodoporphyrin [b] | 0 | 0 |
| L(−)-Prolin [d] | 80 | 90 |
| DL-Prolin [c] | 70 | 86 |
| L(−)-Hydroxiprolin [c] | 89 | 75 |
| Pyrrolidin [c] | 0 | 0 |
| DL-Pyroglutaminsäure [c] | 110 | 95 |
| β-Indolylessigsäure [d] | 58 | 72 |
| Isatin [e] | 49 | 64 |

[a] Puriss., C. Roth, OHG Karlsruhe; [b] pur., C. Roth OHG, Karlsruhe; [c] Th. Schuchardt G. m. b. H., München; [d] für biochemische Zwecke, E. Merck AG, Darmstadt; [e] pro Anal., E. Merck AG, Darmstadt.

vorhandenen Stickstoff konkurrieren. Möglicherweise wird bei verstärkter Chlorophyllsynthese der Proteingehalt verringert.

Die in Tab. 3 angeführten Ergebnisse bestätigen diese Überlegungen. Außerdem sind nach Zusatz von EDTA in N-Mangelkulturen die Konzentrationen an SC höher als in den Kontrollen ohne EDTA. Weiter geht aus diesen Versuchen hervor, daß zwar auch die primären Carotinoide synchron mit den Chlorophyllen bei Zusatz von EDTA vervierfacht werden, jedoch bei N-Mangel nicht in dem Maße verschwinden, daß aus ihnen die gefundenen SC-Konzentrationen entstehen können.

Nach Dersch (1960) wird auch durch Fe-Mangel geringe SC-Bildung ausgelöst. In Übereinstimmung mit unserer Hypothese deuten wir diese Ergebnisse folgendermaßen. Da bei Fe-Mangel vor allem die Verknüpfung von Succinyl-CoA mit Glycin zur δ-Aminolävulinsäure blockiert ist (Bogorad, 1965, 1966), werden möglicherweise Vorstufen der Chlorophyllsynthese angereichert und für den Aufbau der SC ver-

Tabelle 3. *Quantitative Zusammensetzung der primären und sekundären Pigmente in N-Mangelkulturen von* Ankistrodesmus braunii 202-7c *nach Zusatz von EDTA*

Angaben der Chlorophylle a + b (Chl.), der primären Carotinoide (prim.C.) und der Sekundär-Carotinoide (SC) in mg Pigment/g Trockengewicht (TG); TG und Protein (Prot.) in mg/ml Algensuspension; die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Gehalt in mg/300 ml Algensuspension (= 1 Kulturkolben); das Prot. wurde nach Lowry u. Mitarb. (1951) bestimmt

| | 8 Tage alte Kultur | | | | | 35 Tage alte Kultur | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | TG | Prot. | Chl. | prim.C. | SC | TG | Prot. | Chl. | prim.C. | SC |
| Kontrolle (Nährlösung 2) | 0,27 (81,0) | 0,14 (52,0) | 16,7 (1,4) | 2,4 (0,2) | 0,0 (0,0) | 0,80 (240,0) | 0,15 (45,0) | 0,1 (0,02) | 0,7 (0,2) | 1,1 (0,3) |
| dto. ohne Fe + $10^{-4}$ m Fe · EDTA | 0,24 (72,0) | 0,10 (30,0) | 44,0 (3,2) | 8,3 (0,6) | 0,0 (0,0) | 0,74 (222,0) | 0,09 (27,0) | 0,2 (0,04) | 2,5 (0,6) | 3,4 (0,8) |
| dto. ohne Fe + $10^{-3}$ m Fe · EDTA | 0,21 (66,0) | 0,11 (33,0) | 69,1 (4,6) | 11,2 (0,7) | 0,0 (0,0) | 0,75 (225,0) | 0,11 (33,0) | 0,2 (0,05) | 3,4 (0,8) | 4,9 (1,1) |

wendet. Unsere wiederholten Versuche, durch Zugabe von δ-Aminolävulinsäure (als Na-Salz; hergestellt aus dem Hydrochlorid der Firmen Th. Schuchardt, München, und Serva, Heidelberg, durch Zusatz äquimolarer Mengen $NaHCO_3$) diesen Block aufzuheben, schlugen jedoch fehl. *Ankistrodesmus braunii 202-7c*, *Chlorella fusca 211-8b* und *Scenedesmus obliquus 276-3d* konnten diese Verbindung nicht assimilieren. Auch Zusätze von Glycin oder Succinat erhöhten nicht direkt die SC-Konzentration. Nur mittelbar, als N- bzw. C-Quelle, steigerten sie das Wachstum und damit den primären Pigmentgehalt. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Chichester (1966; persönliche Mitteilung) von Interesse, daß bei einigen Pilzen (z. B. *Phycomyces*-Arten) δ-Aminolävulinsäure die Carotinoidkonzentration verdoppelt. Auch Kirk (1968) zeigte kürzlich, daß in *Euglena gracilis* nach Zusatz dieser Aminosäure sowohl der Chlorophyll- als auch der Carotinoidgehalt gesteigert werden.

An dieser Stelle seien entsprechende Versuche zur Erhöhung der SC-Konzentration durch Zugabe von Phytol erwähnt. Es ist immerhin denkbar (siehe Diskussion S. 227), daß auch Phytol als Diterpen Ausgangssubstanz der SC ist. Unsere Experimente, den Einbau dieser Verbindung zu verfolgen, waren nicht erfolgreich. Bereits $10^{-4}$ m Phytol (C. Roth OHG, Karlsruhe) hemmte in Normal- und in N-Mangelkulturen von *Ankistrodesmus 202-7c*, *Chlorella fusca 211-8b* und *Scenedesmus obliquus 276-3d* das Wachstum zu 80% (bezogen auf die Kontrolle ohne Phytol).

Andererseits wird bei Mg-Mangel in *Chlorella fusca 211-8b* und in *Ankistrodesmus braunii 207-7c* die Chlorophyllbildung zum Teil blockiert, ohne daß gleichzeitig die Synthese der SC einsetzt (Dersch, 1960). Allerdings sind bewegliche Stadien und Dauerformen von *Haematococcus pluvialis 34-1c* und *114* unter diesen Bedingungen reich an SC (vgl. auch Droop, 1954). Ob möglicherweise bei den Chlorococcalen Mg Bestandteil der für die Biogenese der SC verantwortlichen Enzymsysteme ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Experimente zur direkten, vollständigen Hemmung der Chlorophyllsynthese und damit zur Beeinflussung der SC waren nicht erfolgreich. Die bisher bekanntgewordenen Hemmstoffe der Chlorophyllsynthese (z. B. Actinomycine, Puromycin, 5-Fluoruracil, Actidion) wirken über die Störung des Protein- oder Nucleinsäurestoffwechsels (Smillie u. Mitarb., 1963; Nathans, 1964; Morris, 1967; Reich 1966; Kirk, 1968). Da durch diese Substanzen der gesamte Stoffumsatz der Algen reduziert wird, lassen sich keine zwingenden Schlüsse zur Stützung unserer Hypothese ziehen. Partielle Störungen der Chlorophyllsynthese hatten immer eine entsprechend geringere SC-Bildung zur Folge (Czygan u. Lichtneckert, unveröffentlicht).

### Versuche zur Wirkung von CAP auf den Pigmentstoffwechsel

Im Gegensatz zu den an höheren Pflanzen gewonnenen Ergebnissen (Margulies, 1967) hemmt CAP ($10^{-4}$ m) bei einigen Chlorococcalen nur wenig den Aufbau, jedoch stark den Abbau der Chlorophylle und primären Carotinoide sowie die Biogenese der SC (Czygan, 1964a). Daraus

schlossen wir auf einen engen biogenetischen Zusammenhang zwischen beiden Prozessen. Diese Resultate gelten für die von uns untersuchten *Ankistrodesmus*-Stämme *202-7a,7b,7c,6,8,9,11*, *Chlorella*-Stämme *211-8a,8b,8c,15,14a,14b,14c*, *Scenedesmus*-Stämme *276-3d,3e*, und für die *Haematococcus*-Stämme *34-1c,114*. *Crucigenia apiculata 218-1*, *Coelastrum proboscideum 217-2* und die *Scenedesmus*-Stämme *276-4a*, *4b,4c* waren gegen die üblicherweise verwendete CAP-Konzentration von $10^{-4}$ m empfindlich und wuchsen nicht regelmäßig (Czygan u. Lichtneckert, unveröff.; Taylor, 1965).

Zur näheren Prüfung des CAP-Effekts fügten wir dieses Antibioticum nicht wie in früheren Versuchen (Czygan, 1964a) bereits bei Versuchsanfang, sondern erst bei Beginn des N-Mangels den Kulturen zu. Aus diesen Experimenten geht eindeutig hervor, daß CAP nicht nur die Biogenese, sondern auch die Aktivität der auf- und abbauenden Enzyme hemmt.

Um die Zusammenhänge beider Prozesse zu klären, insbesondere um sie zu trennen, ließen wir CAP-Derivate und Abbauprodukte (Czygan, 1964b) auf den Pigmentstoffwechsel einwirken (Czygan u. König, unveröffentlicht). Acidoamphenicol, DL-threo-1-Phenyl-2-nitropropandiol-(1,3) und D-threo-1-Phenyl-2-aminopropandiol-(1,3) hatten keinen Effekt. D-threo-p-Nitrophenyl-2-aminopropandiol-(1,3) und D-threo-p-Aminophenyl-2-dichloracetamidopropandiol-(1,3) zeigten erst in Konzentrationen von $10^{-3}$ m einen mit CAP vergleichbaren Einfluß. Prinzipiell war er jedoch von dem des CAP nicht zu unterscheiden.

Eine Trennung der Chlorophyll abbauenden und der SC aufbauenden Vorgänge und damit die Klärung der Frage, welcher von ihnen spezifisch durch CAP gehemmt wird, gelang uns mit *Chlorella zofingiensis 211-14a*. Wachstum und Pigmentierung dieser Alge sind pH-Wert-abhängig. Während sie bei pH 7,0 in Normalnährlösung (Lsg. 1) normal wächst und Chlorophylle und primäre Carotinoide synthetisiert, stellt sie ihr Wachstum unterhalb von pH 5,0 ein und bildet bei pH 6,0 trotz ausreichender N-Versorgung (Nitrat, Glutaminsäure, $NH_4Cl$) Astaxanthinester und Canthaxanthin neben primären Carotinoiden und Spuren von Chlorophyllen (Kessler u. Czygan, 1965). Wird diese Alge in Gegenwart von CAP ($10^{-4}$ m) kultiviert, verhält sie sich bei pH 7,0 wie *Ankistrodesmus* und *Chlorella fusca*. Dagegen wird sie bei pH 6,0 orangerot und unterscheidet sich nur durch ein um etwa 10—15% herabgesetztes Wachstum von der Kontrolle. Damit ist bewiesen, daß der eigentliche durch CAP gehemmte Vorgang der Abbau der Chlorophylle und nicht der Aufbau der SC ist. Da aber nach unserer Hypothese die SC aus Abbauprodukten der Chlorophylle entstehen, wird unter „normalen" Bedingungen auch indirekt die Biogenese der SC gehemmt. Vermutlich werden in pH-6-Kulturen von *Chl. zofingiensis* nicht für die Chlorophyllsynthese verwendete Vorstufen zur Bildung der SC benutzt.

## Versuche zur Wirkung von Glucose, Acetat und Succinat auf den Stoffwechsel der SC

Bereits Chodat (1913) beobachtete, daß einzelne Grünalgenarten auf Glucose-Agar ihre grüne Farbe verlieren und ausbleichen, andere dagegen sich gelb oder orange färben. Diese Farbverschiebung, insbesondere die Herabsetzung der Chlorophyllkonzentration, ist häufig beschrieben worden (unter anderem Bergmann, 1955; Kol, 1961; Pringsheim, 1963; Aoki u. Mitarb., 1965; Huth, 1967).

Nach unseren Versuchen mit *Ankistrodesmus braunii 202-7c* und *Chlorella fusca 211-8b* erhöhen Glucose-Zusätze (0,2%) in Normal- und in N-Mangelkulturen die Wachstumsrate (ber. als Trockengewicht) um das 2—3fache. In beiden Kulturen steigt außerdem die Konzentration an primären Carotinoiden (ber. als µg Pigment je Gramm Trockengewicht und als µg Pigment je Kulturkolben). In Normalkulturen nimmt der Chlorophyllgehalt je Kolben zu, in N-Mangelkulturen wird er erniedrigt. SC treten erst nach Verbrauch des N auf. Ihre Konzentration ist gleich oder etwas geringer derjenigen der Glucose-freien Kontrollen (nach 4 Wochen bei *Ankistrodesmus 202-7c*: 190 µg/Kolben) und entspricht nicht den 10—20% der unter diesen Bedingungen abgebauten primären Carotinoide.

Grundsätzlich lassen sich diese Resultate auf zwei Weisen deuten. Glucose, möglicherweise auch andere Kohlenhydrate, hemmen spezifisch die Enzyme der Chlorophyll-Biogenese. Farblose Vorstufen werden dann angereichert und in solchen Algen, die dazu in der Lage sind, zum Aufbau der SC verwendet. Nach unseren Ergebnissen ist eine andere Erklärung jedoch wahrscheinlicher. Durch das erhöhte Wachstum wird der normale N-Vorrat schneller verbraucht. Das Chlorophyll wird abgebaut und die Abbauprodukte werden entsprechend unserer Hypothese zur SC-Bildung benutzt. So werden z. B. in Flüssigkeits- und Agar (2%)-Kulturen bei ausreichender N-Versorgung ($2 \cdot 10^{-2}$ m Nitrat; 0,7% Pepton oder Proteose) nach Zusatz von Glucose (0,2—2%) erst *nach* Verbrauch des N SC gebildet (gefunden bei allen Stämmen von *Ankistrodesmus*, *Chlorella fusca*, *Chl. zofingiensis*, *Coelastrum*, *Crucigenia*, *Dictyococcus*, *Scotiella*, *Scenedesmus* und bei den *Chlorococcum*-Stämmen *213-1a,1b,2a,2b,5,6,7,8,11*; vgl. aber *213-4*: Czygan u. Kessler, 1967). Der Einfluß von Glucose auf den Stoffwechsel der SC ist also nur indirekt. Dagegen wird die Konzentration der primären Carotinoide unmittelbar erhöht. Der Quotient $\frac{\text{Chlorophylle}}{\text{Carotinoide}}$ fällt z. B. in 10 Tage alten Normalkulturen von *Ankistrodesmus braunii 202-7c* von etwa 5,8 (Kontrolle ohne Glucose) auf 3,1 (mit 0,5% Glucose). Vermutlich wird Glucose nach den bekannten Abbaureaktionen veratmet und über Acetyl-CoA in den primären Polyenstoffwechsel eingeschleust.

Die indirekte Rolle der Glucose beim SC-Stoffwechsel unterstützen auch neueste Ergebnisse von Wild u. Egle (1967). Sie zeigten, daß Glucose (0,2%) in Abhängigkeit von der genetischen Konstitution der

Grünalgen die Chlorophyllkonzentration erhöht, erniedrigt oder überhaupt nicht beeinflußt. Es scheint also keine prinzipielle Hemmung des Mechanismus der Chlorophyllsynthese zu bestehen.

Die Wirkungen von Acetat (0,1%) und Succinat (0,2%) auf den Pigmentstoffwechsel von *Chlorella fusca 211-8b* und *Ankistrodesmus braunii 202-7c* gleichen denen der Glucose. Allerdings wird das Wachstum der Algen nur um etwa 10—25% erhöht. Möglicherweise ist dies auch die Erklärung für die Beobachtung von Pringsheim (1963, S. 271), daß manche Chlorellen auf Acetat-Agar im Gegensatz zu Glucose-Agar-Kulturen nicht ausbleichen.

Gegen diese Annahme, daß die Bildung der SC nur indirekt durch Kohlenstoffquellen beeinflußt wird, spricht jedoch einmal die Angabe von Buetow (1967), daß Acetat die Chlorophyllsynthese in *Euglena* hemmt. Zum anderen erwähnt z. B. Pringsheim (1963; S. 271; 399), daß bei *Chlorella luteoviridis* und *Ch. variegata* nach Glucosezusatz die Synthese der Chlorophylle zurückgeht, daß aber nach Verbrauch des Zuckers die Kulturen wieder langsam ergrünen. Möglicherweise handelt es sich um artspezifische Eigenschaften. Inwieweit daher unsere Deutung des Glucoseeffects nur auf photoautotroph wachsende Chlorococcalen beschränkt ist, bleibt weiteren Versuchen vorbehalten.

*Versuche zur Identifizierung von Zwischenprodukten*

Entscheidend für die Stützung unserer Arbeitshypothese war die Suche nach Zwischenprodukten der postulierten Kette Chlorophylle → SC. Auf drei Wegen versuchten wir, Zwischenstufen zu fassen und ihre Aufeinanderfolge zu bestimmen.

a) Durch partielle Hemmung des Chlorophyllabbaus und damit des SC-Aufbaus mit CAP. b) Durch Identifizierung einiger in verschiedenen Chlorococcalen-Mutanten angereicherter Zwischenstufen. c) Durch Reversionsversuche mit Mutanten.

Partielle Hemmung des Chlorophyllabbaus und der Synthese der Sekundär-Carotinoide durch CAP

*Ankistrodesmus braunii 202-7c* und *Chlorella fusca 211-8b* kultivierten wir 10 und 40 Tage lang in N-Mangelnährlösung (Lsg. 2) unter Zusatz von $10^{-4}$ m, $5 \cdot 10^{-5}$ m und $10^{-5}$ m CAP. Die Pigmentzusammensetzung der 10 Tage alten Algen entsprach derjenigen der Kontrollen. In den 40 Tage-Kulturen mit $10^{-4}$ m CAP waren dünnschichtchromatographisch neben primären Pigmenten Spuren nicht identifizierbarer Chlorophyllabbauprodukte nachzuweisen. Nach Zusatz von $10^{-5}$m CAP wurden die Chlorophylle fast völlig abgebaut und SC traten auf. In den mit $5 \cdot 10^{-5}$ m CAP behandelten Algen waren zwar auch Spuren von Astaxanthin zu finden, außerdem jedoch neben den primären Lipochromen einige Porphyrinderivate, deren genauere Analyse beschrieben werden soll.

Die Algen wurden bei schwachem Tageslicht mit Seesand, $CaCO_3$, $Na_2SO_4$ (anhydr.) und Aceton homogenisiert und mit Aceton bis zur Farblosigkeit des Rückstands extrahiert. Die Farblösung engten wir unter Stickstoff auf wenige Milliliter ein. Dieser Farbextrakt wurde nach dem üblichen Verfahren (siehe Czygan, 1968) säulenchromatographiert. Die intakten Chlorophylle und Carotinoide verwarfen wir und trennten die Chlorophyllderivate erneut über Kieselgel-G-Säulen (2 cm ⌀; 30 cm lang; 1 Std getrocknet bei 60° C) oder über die üblichen Kiesel-G-Platten mit Benzol/Methanol (+ 5% nHCl)-Gemischen als Elutionsmittel. Zur scharfen Separierung der einzelnen Fraktionen (zum Teil über den Fraktionssammler Radi Rac, LKB, Stockholm) mußten wir in den verschiedenen Chargen unterschiedliche Benzol/Methanol-Verhältnisse benutzen. Für die dünnschichtchromatographische Verteilung verwendeten wir meistens 80 Volumen-Teile Benzol + 20 Volumen-Teile Methanol.

Während zwei Substanzen in den Kulturen von *Ankistrodesmus* und von *Chlorella* regelmäßig auftraten (F 1 und F 2), waren 3—5 weitere Fraktionen nur in Spuren gelegentlich nachzuweisen und bisher nicht zu bestimmen. Parallel zu diesen mit CAP behandelten Algen analysierte Kontrollen zeigten diese Chlorophyll-Abbauprodukte nicht. Es handelt sich bei ihnen also nicht um während der Aufarbeitung entstandene Artefakte. F 1 und F 2 haben die in Tab. 4 angegebenen Charakteristica. Beide Verbindungen konnten wir nicht kristallin gewinnen. Die Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich der chromatographisch reinen Substanzen zeigt Tab. 5. Sie stimmen mit denen von authentischem Phäophytin a[2] bzw. von Hämatoporphyrin[2] überein (Smith u. Benitez, 1955; Falk, 1964; Goedheer, 1966). Zusätzlich stellten wir nach Veresterung von F 2 — und parallel dazu des Hämatoporphyrins — mit

[2] Phäophytin a wurde nach Smith u. Benitez, 1955, und Hämatoporphyrin aus dem Dichlorid der Fluka AG, Buchs nach Porra u. Jones, 1963, hergestellt.

Tabelle 4. *Eigenschaften zweier Chlorophyll-Abbauprodukte aus Chloramphenicol-Kulturen von* Ankistrodesmus braunii *202-7 c und von* Chlorella fusca *211-8 b (vgl. S. 227)*

| Kriterium | aus *202-7 c* isolierte Substanzen | | aus *211-8 b* isolierte Substanzen | | authentische Substanzen (vgl. Tab. 5) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | F 1 | F 2 | F 1 | F 2 | Phäophytin a [a] | Hämatoporphyrin |
| HCl-Zahl [a] | 30 | 0,1 | 29—31 | 0,1 | 29–30 | 0,1 |
| Phasentest [a] | positiv | negativ | positiv | negativ | positiv | negativ |
| Dehydration der α-Hydroxiäthyl-gruppen [b] | | positiv | | positiv | | positiv |

[a] Nach Smith u. Benitez (1955); [b] als Dimethylester (siehe S. 221) nach Clezy u. Barrett (1961) mit p-Toluolsulfonsäure (in Benzol) in den Methylester des Protoporphyrins überführt, der spektrophotometrisch nach Falk (1964) identifiziert wurde.

Methanol/HCl aus dem Dimethylester nach den Angaben von Doss u. Burger (1967) das acetylierte Produkt her (Essigsäureanhydrid/Pyridin: 1/10 Volumen-Teile; bei Zimmertemperatur 10 Std acetyliert). Im dc-System (Kieselgel H als Adsorbens; Benzol/Methanol/Butanol, 82:14:3 Volumen-Teile als Laufmittel) ließen sich die acetylierten Produkte von F 2 und Hämatoporphyrin ebenso wie ihre nicht acetylierten Dimethylester nicht trennen.

Bereits Granick u. Mitarb. (1953) konnten Hämatoporphyrin als mögliche Chlorphyllvorstufe aus einer *Chlorella*-Mutanten isolieren. Vermutlich handelt es sich jedoch um ein Artefakt, das aus dem ursprünglichen Protoporphyrin entstanden ist (Falk, 1964). Daß F 2 in unseren Versuchen ebenfalls als Vorstufe der Chlorophyllsynthese angereichert wurde, ist unwahrscheinlich. F 2 tritt ebenso wie F 1 erst bei teilweiser Hemmung des Abbaus auf.

Unsere Suche nach farblosen Vorstufen der Polyene in den mit CAP versetzten und in normalen (Lösung 1 und Lösung 2) *Ankistrodesmus*- und *Chlorella*-Kulturen war erfolglos. Es gelang uns bisher nicht, in Fraktionsanalysen [Fraktionssammler RadiRac; $Al_2O_3$-(aktiviert)-Säule; Hexan + 5—10 Vol-% Äthyläther] Phytoen, Phytofluen oder andere $C_{10}$-, $C_{30}$- und $C_{40}$-Polyene nachzuweisen (Fluorescenz; Absorptionsspektren). Vermutlich werden diese Verbindungen sofort nach ihrer Bildung weiterverarbeitet. Freies Phytol fanden wir in Spuren in mit $10^{-4}$ m und $5 \cdot 10^{-5}$ m CAP behandelten 15 Tage alten Kulturen (Lsg. 1 und 2) von *Ankistrodesmus braunii 202-7c* und *Chlorella fusca 211-8b*. Es wurde in der oben angegebenen Weise mit dem Fraktionssammler abgetrennt und dünnschichtchromatographisch identifiziert (nach Stahl u. Jork, 1962; Vergleichssubstanz: C. Roth, OHG, Karlsruhe).

In Übereinstimmung mit den Angaben von Dersch (1960) ließen sich auch nach Zusatz von Diphenylamin, dem bekannten Hemmstoff der Carotinoid-Biogenese (zum Mechanismus der Hemmung vgl. Liaaen Jensen, 1962), keine Vorstufen der SC anreichern.

## Versuche mit Mutanten

Ebenso wie alle *Chlorella fusca*-Mutanten von Bendix u. Allen (1962) (vgl. Kessler u. Czygan, 1966) und wie *Prototheca* und *Hyalorapidium*, wahrscheinlich apochlorotische Arten von *Chlorella* bzw. *Ankistrodesmus* (Czygan, 1968), sind auch die von uns hergestellten UV-Mutanten von *Scenedesmus* und *Ankistrodesmus* nicht in der Lage, bei N-Mangel SC zu synthetisieren. Außerdem bauen die unter Normalbedingungen grünen Mutanten in Übereinstimmung mit den oben erwähnten grünen *Chlorella*-Mutanten bei N-Mangel ihre Chlorophylle und Chlorophyllderivate nicht bis zu farblosen Bruchstücken ab (Tab. 1). Auch dies läßt einen engen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit, Chlorophylle zu katabolisieren, und der Eigenart, SC aufzubauen, vermuten.

Die Mutanten *M-A/1* und *M-A/2*, die in Agarkulturen einen braungrünen Farbstoff bilden und ihn teilweise in das Substrat ausscheiden, wurden in Flüssigkeitskulturen herangezogen und analysiert (siehe S. 221). Unter Normalbedingungen (Lsg. 1) entsprach die Zusammen-

Tabelle 5. *Absorptionsmaxima der Chlorophyllderivate F 1 und F 2 (siehe S. 221) und ihr Vergleich mit authentischen Verbindungen.* In Klammern ist die relative Höhe der Banden angegeben (kleinste Bande = 1); zur Bezeichnung der Banden vgl. Falk (1964); Aufnahme halbautomatisch mit dem PMQII (C. Zeiss)

| Substanz | Lösungsmittel | $\lambda_{max.}$ in nm | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Soret | | IV | III | II | Ia | I |
| F 1 | Äthyläther | 410 (54,1) | | 505 (1,2) | 534 (1) | | 612 (1) | 667 (23,0) |
| Phäophytin a[a] | Äthyläther | 410 | 471 | 505 | 534 | | 613 | 667 |
| Phäophytin a[b] | Äthyläther | 410 | 470 | 505 | 532 | 559 | 608 | 665 |
| Phäophytin a[c] | Äthyläther | 408,5 | 471 | 505 | 534 | 560 | 609,5 | 667 |
| Phäophytin a[d] | Äthyläther | 410 | | 505 | 534 | 560 | 610 | 667 |
| F 2 | Pyridin | 402 (187,5) | | 500 (18,7) | 534 (12,3) | 570 (1,73) | | 625 (1) |
| Hämatoporphyrin[e] | Pyridin | 402 | | 499,5 | 532 | 569 | 596 | 623 |
| Hämatoporphyrin[f] | Pyridin | 402 | | 500 | 532 | 570 | | 625 |

[a] Nach Goedheer (1966); [b] nach Zscheile u. Comar (1941); [c] nach Smith u. Benitez (1955); [d] Phäophytin nach Smith u. Benitez (1955) hergestellt; [e] nach Falk (1964); [f] Hämatoporphyrin der Fluka AG, Buchs, nach Porra u. Jones (1963) gereinigt.

setzung der Pigmente derjenigen des Wildtypes. Bei N-Mangel (Lsg. 2) wurden die primären Polyene qualitativ nicht und quantitativ nur unwesentlich verändert. SC waren nicht zu finden. Gleichzeitig blieben die Kulturen auch nach achtwöchiger Kultur grün. Chlorophylle waren nur noch in geringen Konzentrationen, dafür aber eine Reihe im UV (366, 254 mm) stark rot fluorescierender Substanzen nachzuweisen.

Je nach der untersuchten Charge kamen 3—5 dieser Chlorophyllderivate in höheren Konzentrationen vor. Eine Fraktion (Nr. 1) war nach ihren Eigenschaften (vgl. Tab. 4, 5, 6) mit Phäophytin identisch. Bei den übrigen Verbindungen handelte es sich um Porphyrine. Ihre Absorptionsmaxima sind in Tab. 6 angegeben.

Tabelle 6. *Absorptionsmaxima einiger aus* Ankistrodesmus-braunii-*Mutanten* (M-A/1 *und* M-A/2; *vgl. S. 224*) *isolierter Chlorophyllderivate (vgl. Tab. 5)*

| Substanz | Lösungsmittel | $\lambda_{max.}$ in nm | | | | | | Anmerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Soret | IV | III | II | Ia | I | |
| 1 | Äthyläther | 410 | 505 | 534 | 612 | 612 | 667 | Phäophytin |
| 2 | Pyridin | 406 | 505 | 532 | 574 | | 623 | Ätioporphyrin-Typ |
| 3 | Pyridin | 410 | 505 | 540 | 570 | | 620 | |
| 4 | Pyridin | 402 | 500 | 535 | 566 | 600 | 625 | |
| 5 | Pyridin | 404 | 510 | 540 | 572 | | 633 | |

Nr. 2 war dem bereits oben erwähnten Hämatoporphyrin (vgl. Tab. 4) ähnlich, stimmte jedoch spektralphotometrisch nicht völlig mit ihm überein. Die restlichen Porphyrine konnten noch nicht identifiziert werden.

Aus den grünen (*M-Sc/1*, *M-A/1*, *M-A/2*, *M-A/7* bis *10*) und aus der gelben Mutante (*M-A/5*) konnten wir keine weiteren farblosen Lipoide isolieren, die eine mögliche Verbindung zwischen N-freien Abbaustufen des Chlorophylls und ersten Vorstufen der SC-Biogenese darstellen. *M-A/3*, *M-A/4* und *M-A/6* enthalten Phytoen und Phytofluen.

Die einzigen Mutanten, die bereits unter Normalbedingungen Ketocarotinoide bilden, sind *M-301*, *M-304* und *M-308*. Während *M-304* und *M-308* nur auf Pepton-Hefe-Glucose-Agar (Lsg. 3 + 1,5% Agar) wuchsen, konnten wir *M-301* auch in flüssigen Medien (z. B. Lsg. 3; Lsg. 5) kultivieren. Alle drei Stämme enthalten auch bei ausreichender N-Versorgung Astaxanthinester neben normalen primären Pigmenten und nicht näher identifizierten Chlorophyllderivaten. Canthaxanthin, das zweite SC des Wildtyps, fehlt. Eigenartigerweise wird bei N-Mangel (Lsg. 4) in *M-301* anfangs Astaxanthin *ab*gebaut. Dadurch erscheinen die Kulturen zunächst grün. Nach 40—60 Tagen bleichen sie aus und

bilden anschließend jedoch erneut Astaxanthin und Spuren weiterer noch nicht identifizierter Monoketopolyene (nicht Echinenon). Vermutlich ist in diesen Mutanten die Biogenese der Chlorophylle zum Teil blockiert. Die Vorstufen (Glycin, Phytol u. ä.?) werden bereits unter normalen Bedingungen in die SC eingebaut (siehe auch unsere Versuche zur pH-Wertabhängigkeit der Chlorophyllbildung in *Chlorella zofingiensis* S. 218). Das Verschwinden des Astaxanthins während des Wachsens in Flüssigkeitskulturen hat seine Parallele im Ergrünungsvorgang roter N-Mangelalgen nach Zusatz von N-Quellen. Bereits früher konnten verschiedene Autoren den Einbau von Carotinoid-Abbauprodukten in das Phytol der Chlorophylle wahrscheinlich machen (u. a. Strain, 1938; Granick, 1950; Frank, 1951; Gibson u. Mitarb., 1961; Shlyk u. Mitarb., 1962).

In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß die heterotrophe *Chlorella fusca*-Mutante *211-8o* in N-Mangellösung (Lsg. 2 + 0,2% Glucose) nach dem Abbau der Chlorophylle neben den übrigen primären Carotinoiden verstärkt Zeaxanthin bildet. Dieses Xanthophyll konnte von uns in *Chlorella fusca*-Stämmen nur gelegentlich und in Spuren nachgewiesen werden. Ob sein Vorkommen in der bei N-Mangel von Oxocarotinoiden freien Mutante auf eine Rolle als Zwischenprodukt bei der Biogenese der SC hinweist, bleibt offen.

## Reversionsversuche

Auch in Reversionsversuchen sehen wir eine Möglichkeit, Näheres über die Zwischenstufen der Biogenese der SC zu erfahren. Unter Reversion verstehen wir die Fähigkeit von Mutanten, einige oder alle Eigenschaften der Ausgangsform wiederzuerlangen. Reversion ziehen wir dem Ausdruck „Rückmutation" vor, da eine Sexualität der Gattungen *Chlorella* und *Ankistrodesmus* bisher unbekannt und bei *Scenedesmus* nur in Ausnahmefällen nachgewiesen worden ist (vgl. Trainor u. Burg, 1965; Kessler u. Czygan, 1966).

In unseren Untersuchungen mit den *Chlorella fusca*-Mutanten von Bendix u. Allen (1962) lösten wir die Reversion durch CAP aus (zur Methodik vgl. Kessler u. Czygan, 1966). Wir konnten zeigen, daß diese Reversion schrittweise vor sich geht. In Weiterführung unserer Experimente gelang es, bei der Reversion der Mutante *C-1.1.10.14* verschiedene Zwischentypen zu isolieren und zu charakterisieren (vgl. Tab. 7). Diese Zwischenformen waren unterschiedlich stabil. Während Phase II erst nach 3—4 weiteren Passagen und erneutem CAP-Zusatz zum Wildtyp revertierte, bildeten sich in Agarkulturen der übrigen Formen spontan Kolonien, die dem Ausgangsstamm entsprachen.

Ob diese Reversionsfolge dem umgekehrten Weg der ursprünglichen Mutationsschritte entspricht, wissen wir nicht. Auf jeden Fall wird die

enge Verknüpfung zwischen der Bildung der SC und dem Abbau der Chlorophylle belegt. Weiterhin beweisen diese Versuchsreihen, daß Canthaxanthin erst nach dem Astaxanthin, vermutlich durch Reduktion dieser Ketoverbindung entsteht. Auch das späte Erscheinen der weniger hoch oxydierten Keto-$\beta$-Carotine in kinetischen Versuchen (vgl. Czygan, 1968; Abb. 5) machte dies bereits wahrscheinlich. In Reversionsversuchen mit den *Chlorella fusca*-Mutanten *211-8o* und *211-8n*, die bei

Tabelle 7. *Reversion der* Chlorella fusca-*Mutante C-1.1.10.14*; *Eigenschaften und Pigmentgarnitur einiger Zwischenformen*

| | | | |
|---|---|---|---|
| I (=C-1.1.10.14) | heterotroph | keine Chl. oder Chl.-Derivate; keine prim. C. | bei N-Mangel keine SC |
| II | heterotroph | keine Chl.; aber Chl.-Derivate, die bei N-Mangel nicht völlig abgebaut werden; prim. C. | bei N-Mangel keine SC |
| III | autotroph | Chl., die bei N-Mangel nicht völlig abgebaut werden; prim. C. | bei N-Mangel keine SC |
| IV | autotroph | Chl., die bei N-Mangel bis auf Spuren abgebaut werden; prim. C. | bei N-Mangel als SC nur Astaxanthinester |
| V (entspricht dem Wildtyp) | autotroph | wie bei Phase IV | bei N-Mangel als SC Astaxanthinester und Canthaxanthin |

Chl. = Chlorophylle; prim. C. = primäre Carotinoide; SC = Sekundär-Carotinoide.

N-Mangel keine SC bilden, erschienen ebenfalls nach sechs- bzw. achtwöchiger Kultur Zwischenformen, die als SC nur Astaxanthinester synthetisieren. Erst nach 5 (*211-8n*) bzw. 6 (*211-8o*) weiteren Passagen auf neue Nährlösung (ohne erneuten CAP-Zusatz!) ließen sich neben Astaxanthinestern auch Canthaxanthin, die typischen SC der Ausgangsform, nachweisen.

Es gelang uns nicht, verschiedene Mutanten von Bendix u. Allen (1962) oder die Stämme *211-8o* bzw. *211-8n* durch UV-Bestrahlung zu revertieren.

Allerdings erhielten wir nach Röntgenbestrahlung (Stabilipan-Apparat von Siemens-Reiniger; bei 140 KV; 14 mA; Eigenfilterung entspricht 2 mm Al; Dosisleistung bei 15,5 cm Abstand Focus-Objekt 652 R/min; angewendete Dosis: 4000 R) der Mutanten *Chlorella fusca 211-8n* und *C-1.1.10.14* Revertanten, die autotroph wuchsen und nach de Analysen Chlorophyll a + b sowie primäre Carotinoide besaßen. Sie waren jedoch nicht fähig, bei N-Mangel völlig auszubleichen und SC zu bilden. Auch nach Übertragung in neue Kulturen (zwei Flüssigkeits- und zehn Agarpassagen innerhalb von 21 Monaten) änderte sich ihr Verhalten nicht.

## 4. Zusammenfassende Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigen, daß auch Carotinoide in verschiedenen Grünalgen als sekundäre Pflanzenstoffe gebildet werden können. Abweichend von der Biogenese vieler Sekundärstoffe höherer Pflanzen werden die SC jedoch erst gegen Ende der Entwicklungsphase, bei verlangsamtem Wachstum synthetisiert. Trotzdem deutet die Veresterung der Oxipolyene mit nur einigen der zur Verfügung stehenden Fettsäuren (vgl. Czygan, 1968) auf spezifisch gesteuerte Enzymreaktionen dieser „alten" Zellen hin. Der Stoffwechsel ist in den Mangelalgen nicht zusammengebrochen. Die Enzymsysteme arbeiten nicht regellos [vgl. Eichenberger u. Grob (1962), zur Veresterung der Xanthophylle im Herbstlaub].

Unterschiedlich zur Biogenese der Sekundärstoffe höherer Pflanzen ist auch der Weg, der zu den SC führt. Während z. B. bei der Bildung ätherischer Öle primäre und sekundäre Biosynthesesysteme um die gemeinsamen Vorstufen konkurrieren, werden die SC nicht nach dem Schema der primären Polyenfarbstoffe aufgebaut. Es wurde bereits an anderer Stelle (S. 211) erörtert, daß die SC nicht direkte Reduktions- oder Oxydationsprodukte der ursprünglich in den Algen vorhandenen primären Carotinoide sein können. Weiterhin ist der enge biogenetische Zusammenhang zwischen Chlorophyll- und SC-Stoffwechsel auffallend und von uns experimentell belegt worden. Unser daraus gezogener Schluß, daß Abbauprodukte oder auch Vorstufen der Chlorophylle das Ausgangsmaterial für die Biogenese der SC sind, soll im folgenden zusammenfassend diskutiert werden.

Es bleibt offen, ob die Grünalgen nur das Phytol, nur den Porphyrinring oder beide Teile der Chlorophyllmolekel in die SC einbauen können. Bereits Kuhn u. Grundmann (1932) vermuteten, daß in Tomaten das bei der Reife verschwindende Chlorophyll abgebaut und sein Phytol-Anteil für die Synthese des Lycopins Verwendung finden kann. Diese Autoren zeigten jedoch, daß die zur Verfügung stehende Phytolmenge zu gering ist. Wir konnten die Angaben für gelb- und rotfrüchtige Formen von *Lycopersicon esculentum* bestätigen (Czygan u. Willuhn, 1967).

Diese Verhältnisse scheinen jedoch nicht für alle Pflanzen zu gelten. Bei den von uns untersuchten Grünalgen ist meistens diese Voraussetzung der Hypothese erfüllt. In einem Kulturkolben (300 ml Lsg. 2) von *Ankistrodesmus braunii 202-7c* erreicht zwischen dem 8. und 10. Tag die Chlorophyllkonzentration mit $2{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mol ihr Maximum. Astaxanthin fehlt diesen Algen. Nach 35 Tagen beträgt die Astaxanthinkonzentration $0{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mol je Kolben. Chlorophylle sind quantitativ nicht mehr bestimmbar. Unabhängig davon, ob das Phytol ($C_{20}$), der Porphyrinring ($C_{34}$) oder Teile davon verwendet werden, steht damit zur Bildung der SC ($C_{40}$) genügend Chlorophyll zur Verfügung.

Die Beziehungen zwischen dem Diterpen Phytol und den Tetraterpenen sind verschiedentlich untersucht worden (Zusammenfassung bei Goodwin, 1958, S. 196; Goodwin, 1960, S. 120; Egle, 1960a, S. 324; Simonis, 1960, S. 279; Ramirez u. Tomes, 1964). Meistens wurde jedoch gezeigt, daß Carotinoide Präcursoren des Phytols und damit des Chlorophylls sein können. Im Gegensatz zu diesen Resultaten wiesen Godnev u. Rotfarb (1963) den Einbau von markiertem Phytol in Lutein und $\beta$-Carotin nach. Sie verfütterten dieses Diterpen an etiolierte Zwiebelblätter und fanden die Radioaktivität nicht in den Chlorophyllen, sondern in den Polyenen wieder. Es stände also in Übereinstimmung mit unserer Hypothese, daß zwei Phytol-Einheiten nach einer irregulären Schwanz-zu-Schwanz-Kondensation einen $C_{40}$-Körper bilden können. Inwieweit er sich von der noch stark gesättigten $C_{40}$-Vorstufe der primären Carotinoide unterscheidet, wissen wir nicht. Nach wie vor sind auch die Strukturen dieser Verbindungen nicht endgültig aufgeklärt (Czygan, 1967).

Eine andere Möglichkeit zum Aufbau der $C_{40}$-Einheit der SC aus dem Chlorophyll a ist in Abb. 1 aufgezeichnet. Nach Entfernung des Mg und anschließender Assimilation der Stickstoffatome (möglicherweise über eine hämatoporphyrinähnliche Zwischenstufe) lassen sich im Grundgerüst 4 Isoprenoid-Einheiten erkennen (o——o, ×——×, •——•, △——△). Zwei von ihnen (o——o ×——×) sind Schwanz-zu-Schwanz, die beiden restlichen Kopf-zu-Schwanz kondensiert. Theoretisch kann die Verknüpfung der SC-Vorstufen aus zwei Porphyrin-Molekeln folgendermaßen vor sich gehen: 1. An die beiden Kopfenden der Schwanz-zu-Schwanz verbundenen $C_{10}$-Einheit wird je eine Kopf-zu-Schwanz kondensierte $C_{10}$-Einheit angeknüpft. 2. Die beiden Kopfenden dieses $C_{30}$-Körpers können jetzt mit je einer $C_5$-Einheit nach dem Kopf-zu-Schwanz-Schema reagieren. Die nach dieser Annahme entstandene $C_{40}$-Molekel hat damit die „richtige" Anordnung der isoprenoiden Untereinheiten.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß in der präparativen Chemie zur Synthese von $\beta$-Carotin und $\beta$-Carotin-Derivaten $C_{20} + C_{20}$-, $C_5 + C_{30} + C_5$- und $C_{15} + C_{10} + C_{15}$-Kondensationen benutzt werden (Isler u. Schudel, 1963; Weedon, 1967).

Von Bedeutung für unsere Arbeitshypothese, besonders aber für die Annahme, daß bei gestörter Chlorophyllsynthese Vorstufen für den Aufbau der SC Verwendung finden, ist die von Kirk (1968) diskutierte Möglichkeit der Verbindung zwischen Chlorophyll- und Carotinoidbiogenese. Diese Überlegung geht davon aus, daß das Verhältnis Carotinoide zu Chlorophylle niemals unter einen bestimmten Wert fällt. Vielleicht wird der Steuerungsmechanismus der Carotinoidsynthese durch Zwischenprodukte des Chlorophyllbiogeneseweges beeinflußt. Ob eine dieser Vorstufen mit $\delta$-Aminolävulinsäure identisch ist, bleibt noch offen.

Unsere Ergebnisse schließen sicherlich nicht aus, daß bei der Synthese der SC aus Bruchstücken des Chlorophylls, dieses vollständig abgebaut und erst aus den dabei entstehenden $C_5$- oder $C_2$-Einheiten die Polyene aufgebaut werden. Diese Präcursoren müssen sich jedoch in ihren Strukturen oder in der Art der Verknüpfung von denen der primären Carotinoide unterscheiden. Sonst wäre nicht einzusehen, warum die

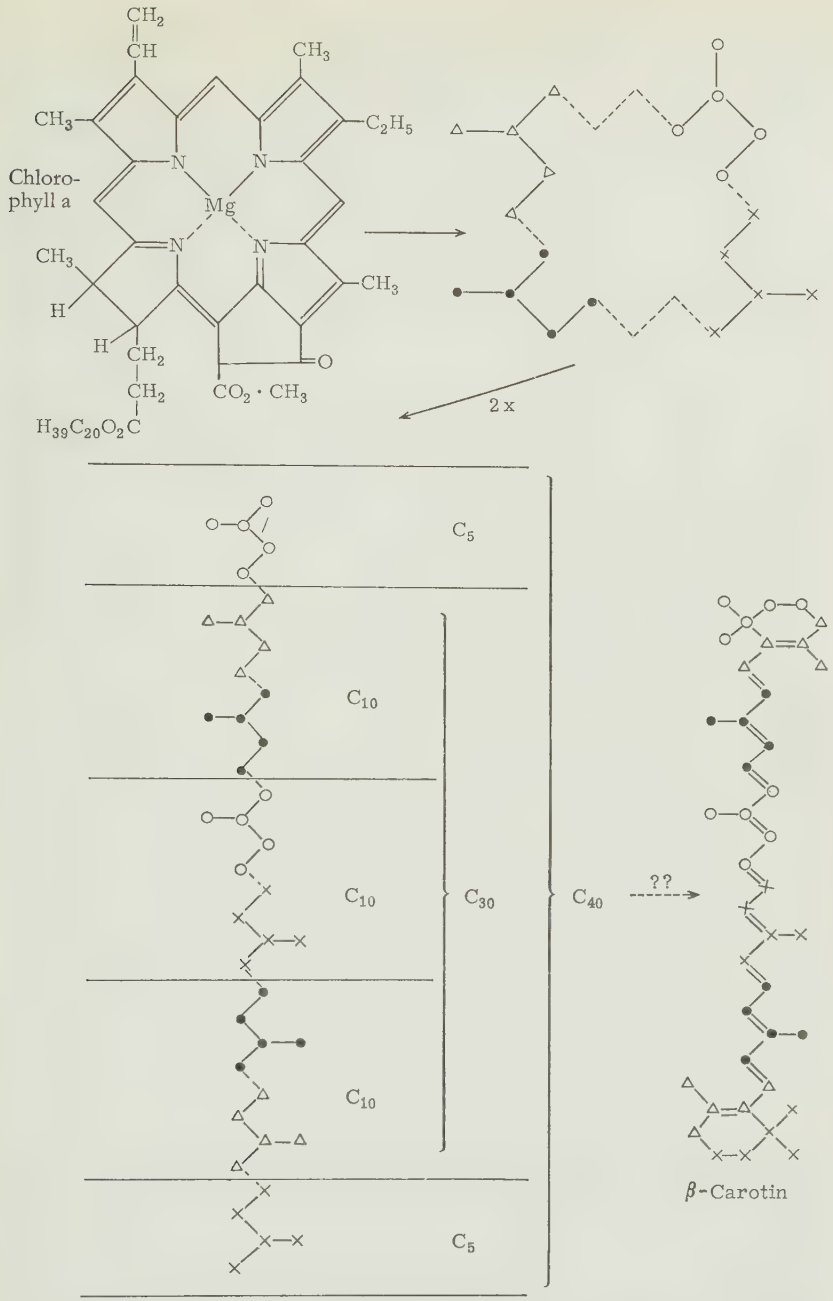


Abb. 1. Hypothetischer Umbau des Prophyringerüsts des Chlorophyll a zu einem $C_{40}$-Polyen

auch in alten N-Mangelzellen vorhandenen Enzymsysteme nicht vermehrt primäre Carotinoide synthetisieren.

Eine Aussage darüber, in welcher Weise die $C_{40}$-Vorstufen der SC dehydrogeniert werden, welches die ersten gefärbten Polyene sind und auf welcher Stufe die Mono- und Bicyclisierungen stattfinden, lassen unsere Untersuchungen nicht zu. Daß $\beta$-Carotin eine Zwischenstufe zur Biogenese der SC ist, machen unsere Experimente mit *Trentepohlia* (Czygan u. Kalb, 1966) und *Dunaliella* wahrscheinlich. Hier wird bei N-Mangel verstärkt $\beta$-Carotin produziert. Auch in Mangelzellen von *Haematococcus* wird nicht nur die Konzentration an SC sondern auch der Gehalt an $\beta$-Carotin erhöht (vgl. Czygan, 1968; Tab. 4). Die Oxydation des $\beta$-Carotins zum Astaxanthin in einem Schritt ist nicht denkbar. Oxi- bzw. Oxi-Oxo-Polyene werden nicht faßbare Zwischenstufen sein. Solche Verbindungen konnten wir dagegen beim Aufbau von Keto-Carotinoiden in niederen Krebsen nachweisen (vgl. Czygan, 1966). Die Anreicherung von Zeaxanthin bei N-Mangel in der Mutante *Chlorella fusca 211-8o* kann auf eine Rolle dieses Xanthophylls als Vorstufe der SC hindeuten. Sicherlich werden die in *Chlorella* und *Scenedesmus* synthetisierten weniger hoch oxydierten Oxo-Polyene Canthaxanthin und Echinenon nicht vor dem Astaxanthin gebildet (vgl. Czygan, 1968; S. 98). Wie die kinetischen und vor allem die Reversionsversuche zeigen, ist zumindest das Canthaxanthin ein Reduktionsprodukt des Astaxanthins. Auch in höheren Pflanzen kennen wir Enzymsysteme, die sauerstoffhaltige Carotinoide, z. B. Epoxide, reduzieren (Schnepf u. Czygan, 1966). Die parallel mit der Verlagerung des Astaxanthins in die Fettvacuole verlaufende Veresterung schließt die SC-Bildung ab.

In Abb. 2 sind die diskutierten Möglichkeiten zur SC-Biogenese zusammengefaßt. Einzelne der von uns mitgeteilten Befunde lassen sich sicherlich auch anders deuten. Einer gemeinsamen Interpretation aller Tatsachen kommt jedoch unsere Hypothese am nächsten. Unterstützt werden diese Überlegungen, daß SC aus Chlorophyllabbauprodukten entstehen, durch die Versuche mit *Chlorella zofingiensis*. Diese Experimente lassen vermuten, daß auch Chlorphyllvorstufen in den Weg der SC-Synthese eingeschleust werden können (Kessler u. Czygan, 1965).

Daß diese Beziehungen zwischen dem Abbau der Chlorophylle und dem Aufbau spezifischer Carotinoide nicht nur bei den *Chlorophyta* bestehen, machten bereits Untersuchungen von Boresch (1913) an Blaualgen wahrscheinlich. Auch sie bleichen bei N-Mangel teilweise aus. Erste Versuche mit *Anabaena cylindrica* (Stamm *1403-2* der Pringsheim-Sammlung) und mit *Anacyctis* spec. zeigten, daß die Konzentration der Oxocarotinoide (neben Canthaxanthin und Echinenon Spuren unbekannter Ketopolyene), die in diesen Arten bereits zu den primären Pigmenten gehören (vgl. Hertzberg u. Liaanen Jensen, 1966a, b), erhöht und parallel dazu die der Chlorophylle und Phycobiline erniedrigt wird.

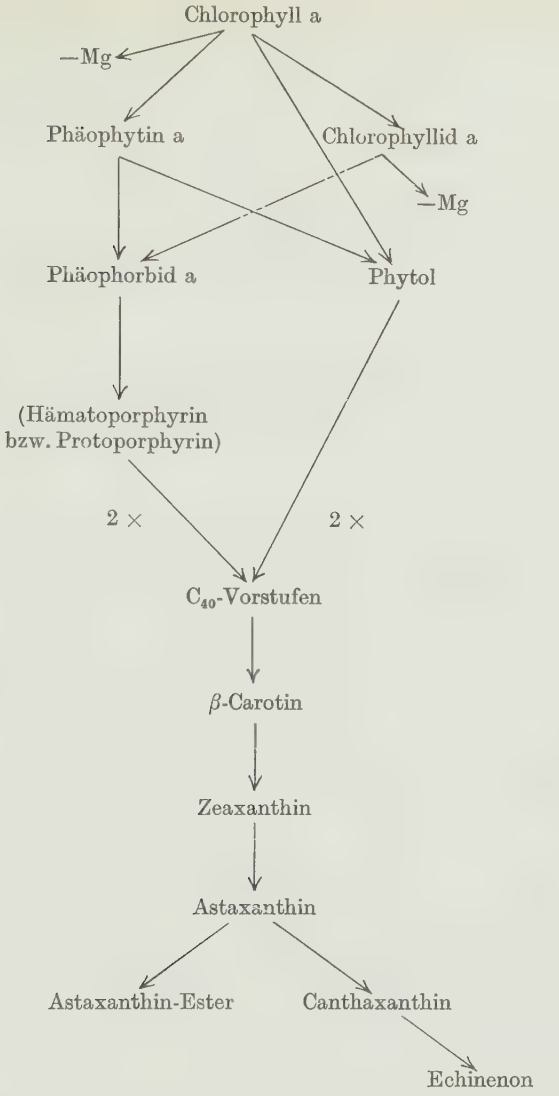


Abb. 2. Hypothetischer Biogeneseweg der Sekundär-Carotinoide einiger Chlorococcalen

Wir haben versucht, die Biogenese der SC zu anderen durch N-Mangel verursachten Änderungen in der Zelle in Beziehung zu setzen.

So lag es nahe, an die Verknüpfung der parallel zum steigenden N-Mangel erhöhten Fettsynthese mit den SC zu denken. Doch beträgt in noch völlig SC-freien Zellen von *Ankistrodesmus braunii 202-7c* der Fettgehalt bis 25% der Trockensubstanz. Wären in den Chlorococcalen Enzymsysteme enthalten, die aus Polyensäuren oder ihren Vorstufen SC bildeten, müßten sie bereits unter normalen Bedingungen aktiv sein. Auch hemmt CAP zwar den Abbau der Chlorophylle und den Aufbau der SC, nicht jedoch die Anreicherung der Fette. In grünen, SC-freien mit CAP behandelten Mangelzellen von *Ankistrodesmus* beträgt der Fettgehalt wie in unbehandelten orangeroten Kontrollen etwa 50% der Trockenmasse.

Auch Hemmversuche mit Diphenylamin sprechen gegen eine Verknüpfung von SC- und Fettbildung. Während der erste Prozeß stark verzögert wird, verläuft der zweite unverändert weiter. Außerdem speichern z. B. Eisenmangelzellen von *Ankistrodesmus* kein Fett, bilden aber SC (Dersch, 1960).

Unsere Vermutung, daß die Synthese der SC mit der Fettsynthese alterniert, bestätigte sich nicht (vgl. für *Phycomyces*: Grob u. Mitarb., 1951). In Mangelzellen von *Chlorella fusca 211-8b* und in solchen der SC-freien Art *Chlorella vulgaris 211-8m* ist der Ölgehalt nach 6 Wochen ungefähr gleich groß (40—53% der Trockensubstanz).

Die Prüfung unserer Hypothese durch Markierung von Vorstufen läßt sich nicht ohne weiteres durchführen. Zwei Wege sind theoretisch denkbar. Markierte Präcursoren der Chlorophylle, etwa Acetat, Succinat oder Glycin (δ-Aminolävulinsäure und Phytol werden nicht von den von uns untersuchten Algen assimiliert), werden verfüttert und in das Chlorophyll eingebaut. Falls unsere Hypothese richtig ist, läßt sich in Mangelkulturen im Idealfall der Hauptteil der Aktivität in den SC nachweisen. Unter diesen Bedingungen werden jedoch so viele weitere Zellbestandteile (primäre Carotinoide, Fettsäuren, Lipide etc.) markiert werden, daß eine Entscheidung über die direkten Vorstufen der SC nicht zulässig sein kann. Auch bei Versuchen, markiertes Chlorophyll oder Porphyrine zu applizieren und ihren Abbau und Einbau in die SC zu verfolgen, ergeben sich voraussehbare Komplikationen. Nur ein Teil dieser Verbindungen kann durch die Zellmembranen permeieren (vgl. Tab. 2). Von diesen Anteilen werden sicherlich Abbauprodukte nicht nur in die SC, sondern auch in andere Lipide und Isoprenoide eingebaut werden. Damit wird jedoch die Markierung stark verschmiert und nur mit Vorbehalt kann dann aus einer Aktivität der SC auf Chlorophyllderivate als Vorstufen geschlossen werden. Es sind aber Versuche vorgesehen, die quantitativen Unterschiede in der Stärke der Markierung für die Prüfung unserer Arbeitshypothese heranzuziehen.

Eine weitere Stützung unserer Annahmen sollen Experimente zur Charakterisierung der chlorophyllabbauenden und SC-aufbauenden Enzymsysteme und weitere Isolierungen von Zwischenprodukten aus Mutanten bringen.

Vor allem bin ich Herrn Prof. Dr. E. Kessler für wertvolle und anregende Diskussionen zu Dank verpflichtet. Mein Dank gebührt weiter Frau C. Zimmermann und Frau R. Hellmann für die sorgfältige Anzucht der Algen, Frau Dr.

M. B. Allen, Herrn Dr. W. Koch und Herrn Dr. P. Schwarze für die mir zur Verfügung gestellten Mutanten, Frl. H. Lichtneckert und Herrn D. König für die fleißige Mitarbeit bei einigen Versuchen, Frl. D. Cruse für die Herstellung der Röntgen-Revertanten, den Firmen Bayer AG, Leverkusen, und C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, für authentisches Chloramphenicol und weitere Phenylpropanderivate und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen.

## Literatur

Aoki, S., J. K. Matsubara, and E. Hase: De- and re-generation of chloroplasts in the cells of *Chlorella protothecoides* V. Degeneration of chloroplasts induced by different carbon sources, and effects of some antimetabolites upon the process induced by glucose. Plant and Cell Physiol. **6**, 487—497 (1965).

Bendix, S., and M. B. Allen: Ultra-violet induced mutants of *Chlorella pyrenoidosa*. Arch. Mikrobiol. **41**, 115—141 (1962).

Bergmann, L.: Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Grünalgen. II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung. Flora (Jena) **142**, 493—539 (1955).

Bogorad, L.: Chlorophyll biosynthesis. In: T. W. Goodwin (Ed.): Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, pp. 29—74. London-New York: Academic Press 1965.

— The biosynthesis of chlorophylls. In: L. P. Vernon and G. R. Seely (Eds.): The Chlorophylls, pp. 481—510. London-New York: Academic Press 1966.

Boresch, K.: Die Färbung von Cyanophyceen und Chlorophyceen in ihrer Abhängigkeit von Stickstoffgehalt des Substrates. J. wiss. Bot. **52**, 145—185 (1913).

Buetow, D. E.: Acetate repression of chlorophyll synthesis in *Euglena gracilis*. Nature (Lond.) **213**, 1127—1128 (1967).

Butler, E. E.: Radiation-induced chlorophyll-less mutants of *Chlorella*. Science **120**, 274—275 (1954).

Chichester, C. O., and T. O. M. Nakayama: The biosynthesis of carotenoids and vitamin A. In: P. Bernfeld: (Ed.): The biogenesis of natural compounds, pp. 475—508. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press 1963.

Chodat, R.: Monographies d'algues en culture pure. Beitr. Kryptogamenflora (Schweiz) **4**, H. 2 (1913).

Ciferri, O.: Metabolismo comparativo delle *Protothecae* e delle mutanti acloriche di *Chlorella*. G. Microbiol. **3**, 97—108 (1957).

Clezy, P. S., and J. Barrett: The prostethic group of cytochrom oxidase. Biochem. J. **78**, 798—806 (1961).

Czygan, F.-Ch.: Untersuchungen über den Abbau von Chloramphenicol durch Grünalgen. Naturwissenschaften **51**, 541—542 (1964a).

— Untersuchungen über die Wirkung von Chloramphenicol auf den Auf- und Abbau der Pigmente einiger Grünalgen. Arch. Mikrobiol. **47**, 251—259 (1964b).

— Über den Stoffwechsel von Keto-Carotinoiden in niederen Krebsen. Z. Naturforsch. **21b**, 801—805 (1966).

— Biosynthese der Carotinoide. Ber. dtsch. bot. Ges. **80**, 627—644 (1967).

— Sekundär-Carotinoide in Grünalgen I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen. Arch. Mikrobiol. **61**, 81—102 (1968).

—, u. K. Kalb: Untersuchungen zur Biogenese der Carotinoide in *Trentepohlia aurea*. Z. Pflanzenphysiol. **55**, 59—64 (1966).

—, u. E. Kessler: Nachweis von 3-Oxi-4,4′-dioxo-$\beta$-carotin in den Grünalgen *Chlorococcum wimmeri* und *Haematococcus* spec. Z. Naturforsch. **22b**, 1085 bis 1086 (1967).

Czygan, u. G. Willuhn: Untersuchungen über Gehaltsänderungen der Lipochrome und Steroidalkaloide in rot- und gelbfrüchtigen Tomaten (*Lycopersicon esculentum* L.) verschiedener Reifegrade. Planta med. **15**, 404—415 (1967).

Dersch, G.: Mineralsalzmangel und Sekundärcarotinoide in Grünalgen. Flora (Jena) **149**, 566—603 (1960).

Droop, M. R.: Conditions govering haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. Arch. Mikrobiol. **20**, 391—397 (1954).

Doss, M., u. H. Burger: Über die Isolierung und Charakterisierung von Hämatoporphyrin. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **348**, 936—938 (1967).

Egle, K.: Biogenese des Chlorophylls, Vorstufen, Beziehung zum Hämin, Protochlorophyll. In: W. Ruhland (Hrsg.): Handb. Pflanzenphysiol., Bd. 5/1, S. 323—353. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960a.

— Biologischer Chlorophyllabbau. In: W. Ruhland (Hrsg.): Handb. Pflanzenphysiol., Bd. 5/1, S. 354—386. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960b.

Eichenberger, W., u. E. C. Grob: Beiträge zur Biochemie pflanzlicher Plastiden, 2. Mitteilung. Über die Herbstcarotinoide von *Acer platanoides* (L.). Helv. chim. Acta **45**, 1556—1563 (1962).

Falk, J. E.: Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam-London-New York: Elsevier 1964.

Frank, S.: The relation between carotenoid and chlorophyll pigments in *Avena* coleoptiles. Arch. Biochem. **30**, 52—61 (1951).

Gibson, K. D., M. Matthew, A. Neuberger, and G. H. Tait: Biosynthesis of porphyrins and chlorophylls. Nature (Lond.) **192**, 204—208 (1961).

Godnev, T. N., u. R. M. Rotfarb: Biosynthetische Wechselbeziehungen zwischen Phytol und Carotinoiden. (russ.) Dokl. Akad. Nauk SSR **153**, 718—720 (1963).

Goedheer, J. C.: Visible absorption and fluorescence of chlorphyll and its aggregates in solution. In: L. P. Vernon and G. R. Seely (Eds.): The Chlorophylls, pp. 147—184. New York-London: Academic Press 1966.

Goodwin, T. W.: Carotenoids. In: W. Ruhland (Hrsg.): Handb. Pflanzenphysiol., Bd. 10, S. 186—222. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

— Chemistry, biogenesis and physiology of the carotenoids. (Carotenoids associated with chlorophyll). In: W. Ruhland (Hrsg.): Handb. Pflanzenphysiol., Bd. 5/1, S. 394—443. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Granick, S.: Magnesium vinyl pheoporphyrin $a_5$, another intermediate in the biological synthesis of chlorophyll. J. biol. Chem. **183**, 713—730 (1950).

— L. Bogorad, and H. Jaffe: Hematoporphyrin IX, a probable precursor of protoporphyrin in the biosynthetic chain of heme and of chlorophyll. J. biol. Chem. **202**, 801—813 (1953).

Grob, E. C., M. Bain et W. H. Schopfer: Recherches sur la formation des lipides et de caroténoides par *Phycomyces* cultivé sur un milieu à base d'acétate de sodium. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) **33**, 1236—1239 (1951).

Hertzberg, S., and S. Liaanen Jensen: The carotenoides of blue-green algae. I. The carotenoids of *Oscillatoria rubescens* and an *Athrospira* sp. Phytochem. **5**, 557—563 (1966a).

— The carotenoids of blue-green algae. II. The carotenoids of *Aphanizomenon flos-aquae*. Phytochem. **5**, 565—570 (1966b).

Huth, W.: Enzyme in grünen Einzellern in Abhängigkeit von der Kohlenstoffversorgung. Flora (Jena) Abt. A **158**, 58—87 (1967).

Isler, O., u. P. Schudel: Synthese und Markierung von Carotinen und Carotinoiden. In: K. Lang (Hrsg.): Carotine und Carotinoide, S. 54—103. Darmstadt: Steinkopff 1963.

Kessler, E.: Iron supply and hydrogenase activity in green algae. Arch. Mikrobiol. **61**, 77—80 (1968).

—, u. F.-C. Czygan: *Chlorella zofingiensis* Dönz: Isolierung neuer Stämme und ihre physiologisch-biochemischen Eigenschaften. Ber. dtsch. bot. Ges. **78**, 342—347 (1965).

— — Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* II. Untersuchungen an Mutanten. Arch. Mikrobiol. **54**, 37—45 (1966).

— — The effect of iron supply on the activity of nitrate and nitrite reduction in green algae. Arch. Mikrobiol. **60**, 282—284 (1968).

— W. Langner, I. Ludewig u. H. Wiechmann: Bildung von Sekundär-Carotinoiden bei Stickstoffmangel und Hydrogenase-Aktivität als taxonomische Merkmale in der Gattung *Chlorella*. Microalgae and photosynthetic bacteria, S. 7—20. Tokyo 1963.

Kirk, J. T. O.: Studies on the dependence of chlorophyll synthesis on protein synthesis in *Euglena gracilis*, together with a nomogram for determination of chlorophyll concentration. Planta (Berl.) **78**, 200—207 (1968).

Koch, W.: Verzeichnis der Sammlung von Algenkulturen am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen. Arch. Mikrobiol. **47**, 402—432 (1964).

Kol, E.: Effect of various carbohydrates on pigment formation and cell division of algae. Acta bot. Acad. Sci. hung. **7**, 303—317 (1961).

Kuhn, R., u. C. A. Grundmann: Die Konstitution des Lycopins. Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1880—1889 (1932).

Lederberg, J., and E. M. Lederberg: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. **63**, 399—406 (1952).

Liaaen-Jensen, S.: The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems. Det Kgl Norske Videnskabers Selskabs Skrifter Nr. 8. Trondheim 1962.

Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. **193**, 265—275 (1951).

Morris, J.: The effect of cycloheximide (actidione) on protein and nucleic acid synthesis by *Chlorella*. J. exp. Bot. **54**, 54—64 (1967).

Margulies, M. M.: Effect of chloramphenicol on chlorophyll synthesis of bean leaves. Plant Physiol. **42**, 218—220 (1967).

Nathans, J.: Puromycin inhibition of protein synthesis: incorporation of puromycin into peptide chains. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **51**, 585—592 (1964).

Porra, R. J., and O. T. G. Jones: Studies on ferrochelatase 2. An investigation of the role of ferrochelates in the biosynthesis of various haem prosthetic groups. Biochem. J. **87**, 186—192 (1963).

Pringsheim, E. G.: Farblose Algen. Stuttgart: Fischer 1963.

Ramirez, D. A., and M. L. Tomes: Relationship between chlorophyll and carotenoid biosynthesis in dirty-red (green-flesh) mutant in tomato. Bot. Gaz. **125**, 221—226 (1964).

Reich, E.: Binding to DNA and inhibition of DNA functions by actinomycins. In: B. A. Newton and P. E. Reynolds (eds.): Biochemical studies of antimicrobial drugs. Cambridge: University Press 1966.

Schnepf, E., u. F.-C. Czygan: Feinbau und Carotinoide von Chromoplasten im Spadix-Appendix von *Typhonium* und *Arum*. Z. Pflanzenphysiol. **54**, 345 bis 355 (1966).

Šesták, Z., and O. Baslerová: Changes in chlorophylls and carotenoids in ageing cultures of green algae as studied by paper chromatography. Microalgae and photosynthetic bacteria, pp. 423—429. Tokyo 1963.

Shlyk, A. A., V. I. Gaponenko, and T. V. Kukhtenko: The kinetics of $C^{14}$ during the renewal of chlorophyll in barley and tobacco plants. Fiziol. Rast. **9**, 521—533 (1962) (nach Chem. Abstr. **58**, 4806h, 1963).

Simonis, W.: Experimentell erzeugte Anpassungen. In: W. Ruhland: Handb. Pflanzenphysiol., Bd. 5/2, S. 269—303. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Smillie, R. M., W. R. Evans, and H. Lyman: Metabolic events during the formation of a photosynthetic from a nonphotosynthetic cell. Brookhaven Sympos. **16**, 89—108 (1963).

Smith, J. H. C., and A. Benitez: Chlorophylls: analysis in plant materials. In: K. Paech u. M. V. Tracey (Hrsg.): Mod. Meth. Pflanzenanalyse, Bd. 4. S. 142—196. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

Stahl, E., u. H. Jork: Terpenderivate, ätherische Öle, Balsame und Harze. In: E. Stahl (Hrsg.): Dünnschichtchromatographie, S. 192—217. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.

Strain, H.: Formation of carotenoids and chlorophylls in etiolated barley seedlings exposed to red light. Plant Physiol. **13**, 413—418 (1938).

Taylor, F. J.: The effect of chloramphenicol on the growth of *Scenedesmus quadricauda*. J. gen. Microbiol. **39**, 275—284 (1965).

Trainor, F. R., and C. A. Burg: *Scenedesmus obliquus* sexuality. Science **148**, 1094—1095 (1965).

Weedon, B. C. L.: Some studies on carotenoid synthesis. Pure appl. Chem. **14**, 265—278 (1967).

Wild, A., u. K. Egle: Zur Bedeutung von Chlorphyll b für die Photosynthese von *Chlorella*. Biol. Zbl. **86** (Suppl.), 495—508 (1967).

Williams, R. J. H., G. Britton, and T. W. Goodwin: The biosynthesis of cyclic carotenes. Biochem. J. **105**, 99—105 (1967).

Zscheile, F. P., and C. L. Comar: Influence of preparative procedure on the purity of chlorophyll components as shown by absorption spectra. Bot. Gaz. **102**, 463—481 (1941).

Dozent Dr. Franz-Christian Czygan
Botanisches Institut der Universität
8520 Erlangen, Schloßgarten 4

## Lebenslauf

Am 25.Oktober 1934 wurde ich in Königsberg (Pr.) geboren, Meine Eltern lebten mit meiner Schwester und mir in meiner Vaterstadt bis Ende 1944. Zu Beginn des Jahres 1945 mußte meine Mutter mit uns Kindern vor der Roten Armee fliehen. Mein Vater wurde im Frühjahr 1945 nach den Kämpfen um die Festung Königsberg in einem sowjetischen Lager ermordet.

Nach verschiedenen Zwischenstationen erreichten wir Wetter in Hessen. Von 1947 bis 1955 besuchte ich das Realgymnasium in Marburg a.d.Lahn. Hier trat ich nach dem Abitur in die Universitäts-Apotheke als Praktikant ein. 1957 bestand ich die Pharmazeutische Vorprüfung und schrieb mich im Sommersemester 1957 in der Philosophischen Fakultät der Philipps-Universität zu Marburg a.d. Lahn für das Fach Pharmazie ein. Im Frühjahr 1960 bestand ich das Pharmazeutische Staatsexamen unter Leitung von Herrn Prof. Dr.H. Böhme.

Im Anschluß an diese Prüfung setzte ich meine naturwissenschaftlichen Studien fort. Ich besuchte vor allem botanische (Prof. Dr.H.Drawert, Prof. Dr.E.Kessler), pharmakognostische (Prof.Dr.H.A.v.Stosch), biochemische (Prof.Dr.Th.Bücher) und pharmakologische (Prof.Dr.W.Schmid) Vorlesungen und Praktika. Im Mai 1961 erhielt ich meine Approbation als Apotheker. Seit August 1962 bin ich mit der Apothekerin Isolde Wehner verheiratet, wir haben drei Söhne. Am 22.Mai 1963 wurde ich mit Allgemeiner Botanik als Hauptfach zum Dr.phil. promoviert. Das pflanzenphysiologische Thema meiner Inaugural-Dissertation (Untersuchungen über die Nitratreduktion der Grünalge Ankistrodesmus braunii in vivo und in vitro) hatte ich von Herrn Prof.Dr.E.Kessler erhalten. Als Nebenfächer wählte ich Pharmazeutische Chemie (Prof.Dr.H.Böhme) und Pharmakologie (Prof.Dr.W.Schmid).

Von Januar 1961 bis Sommersemester 1963 leitete ich als Assistent (m.d.V.b.) unter rechtlicher Verantwortung von Herrn Prof.Dr.H.A.v.Stosch Praktika für Pharmakognosie am Botanischen Institut der Universität Marburg/Lahn. Zusätzlich war mir die Aufgabe übertragen worden, das "Mikroskopische Praktikum für

Lebensmittelchemiker" auszubauen. Vom 1.September 1963 war ich bis Ende Februar des folgenden Jahres Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Seit April 1964 bin ich am Botanischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg bei Herrn Prof. Dr. E.Kessler als wissenschaftlicher Assistent tätig. Ich leitete pflanzenphysiologische Praktika, Übungen zur Anatomie der Pflanzen und Praktika zur Untersuchung pflanzlicher Nahrungs- und Genußmittel.

Am 26.Juli 1967 erteilte mir die Naturwissenschaftliche Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg die venia legendi für Allgemeine Botanik und Pharmakognosie. Das Thema meiner Habilitationsschrift lautete: Sekundär-Carotinoide in Grünalgen.